

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Röntgendiagnostik
(Direktor: Prof. Dr. Friedhelm Heß)
im Radiologiezentrum der Philipps-Universität Marburg
(Direktoren: Prof. Dr. Dr. E. H. Graul und Prof. Dr. F. Heß)

ÜBER DEN EINFLUSS VON RÖNTGENSTRAHLEN
AUF DIE AKTIVITÄT EINES Mg^{2+} -ABHÄNGIGEN,
 Na^{+} - UND K^{+} -AKTIVIERBAREN MIKROSOMALEN
MEMBRAN-ATPase-SYSTEMS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

DETLEV FRÖHLICH
aus Bad Berleburg

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551902_0065

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Röntgendiagnostik
(Direktor: Prof. Dr. Friedhelm Heß)
im Radiologiezentrum der Philipps-Universität Marburg
(Direktoren: Prof. Dr. Dr. E. H. Graul und Prof. Dr. F. Heß)

ÜBER DEN EINFLUSS VON RÖNTGENSTRAHLEN
AUF DIE AKTIVITÄT EINES Mg^{2+} -ABHÄNGIGEN,
 Na^{+} - UND K^{+} -AKTIVIERBAREN MIKROSOMALEN
MEMBRAN-ATPase-SYSTEMS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

DETLEV FRÖHLICH
aus Bad Berleburg

Marburg/Lahn 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen durch den Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 16. Juni 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan : Prof. Dr. Friedrich Neurath

Referent : Prof. Dr. Friedhelm Heß

Correferent : Dr. med. Rolf Prignitz

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Biologische Strahlenwirkung	1
1.2. Strahlenbedingte Funktions- veränderungen an Biomembranen	6
1.3. Eigenschaften einer Membran- Adenosintriphosphatase	8
1.4. Wirkung von herzaktiven Gly- kosiden auf die Membran- ATPase	12
1.5. Fragestellung	14
2. METHODEN	18
2.1. Vorbemerkungen	18
2.2. Darstellung einer mikrosomalen, Mg ²⁺ - abhängigen, Na ⁺ - und K ⁺ - aktivierbaren Adenosintriphos- phatase	19
2.3. Messung der Enzymaktivität	21
2.4. Bestrahlung und herzaktive Gly- koside	23
2.5. Materialien	25
2.6. Statistik	25
3. ERGEBNISSE	
3.1. Abhängigkeit der Strahlenwirkung von der applizierten Strahlendosis	27
3.2. Einwirkung von Röntgenstrahlen und herzaktiven Glykosiden	28

3.3.	Verhalten des ATPase- Systems bis 24 Stunden nach der Bestrahlung	31
3.4.	Tabellen und Abbildungen	33
4.	DISKUSSION	43
4.1.	Strahlensensibilität des Membran- ATPase- Systems	43
4.2.	Mögliche Angriffspunkte des Strah- lenschadens	47
4.3.	Schlußbetrachtung	51
5.	ZUSAMMENFASSUNG	53
6.	LITERATURVERZEICHNIS	55

1. EINLEITUNG

1.1. Biologische Strahlenwirkung

Röntgenstrahlen haben erst ab einem Energiegehalt von $E > 10$ keV eine ionisierende Wirkung (64). Treffen sie als solche ionisierende Strahlen auf biologische Verbände, so rufen sie starke Veränderungen an ihnen hervor (142, s.d. Literaturübersicht). Wenn auch nicht im einzelnen geklärt ist, wie diese Wirkungen herbeigeführt werden, so lassen sie sich vermutlich doch einer der drei folgenden Möglichkeiten zuordnen (142) :

Ionisierende Strahlen wirken

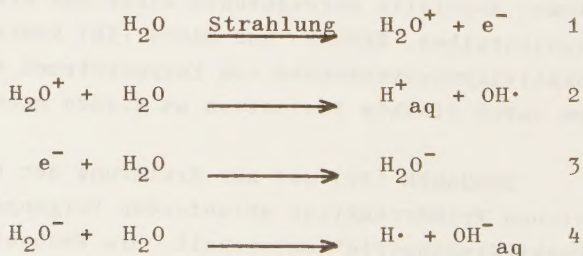
1. direkt als α -, β - und Protonenstrahlen;
2. indirekt als γ - und Röntgenstrahlen, die energiereiche Elektronen aus Atomen herauslösen;
3. als Neutronenstrahlung, die durch Wechselwirkung mit Atomkernen Rückstoßprotonen und Isotope erzeugen.

Alle diese Vorgänge werden nach LEA (67) als Primärreaktionen bezeichnet, von denen bereits 10^6 pro Zelle genügen, um sie zu töten (142). Solche biologischen Schäden sind nach WALLACH und WEIDEKAMM (142) wohl immer den auftretenden Ionisationsvorgängen, nicht aber der bei der Anregung von Atomen ebenfalls entstehenden Wärme und Fluoreszenz zuzuschreiben. KEPNER und MACEY (58) konnten bei Inaktivierungsversuchen von Enzymsystemen Wirkungen durch direkte Ionisation an diesen nachweisen.

DESSAUER (22) hat zur Erklärung der bei einer solchen Primärreaktion ablaufenden Vorgängen seine "Punktwärmethorie" entwickelt. Die Wechselwirkung von Strahlung und Materie soll danach eine starke

Erwärmung als Trefferwirkung (11) in einem volumen -
mäßig sehr kleinen "Trefferbereich" (17) hervor-
rufen, die zur thermischen Zerstörung (Wärmedenatu-
rierung) der Proteine führen soll.

Bei der Beschreibung der angesprochenen Vor-
gänge muß noch ein weiterer Faktor eingerechnet
werden, ohne den der Umfang der biologischen Strah-
lenschäden nicht denkbar wäre. RAJEWSKI (99, 100)
hat das obenerwähnte Treffermodell (11,17) weiter-
entwickelt und von einer zusätzlichen, indirekten
Trefferwirkung gesprochen. WEISS (143,144) hat ähn-
liches vermutet und angenommen, daß bei einem Treffer
durch ionisierende Strahlen eher das die biologischen
Strukturen als Lösungsmittel umgebende Wasser (der
Wassergehalt in der Muskelzelle des Meerschweinchen-
herzvorhofes beträgt etwa 80 % (98)) durch die
Strahlenwirkung betroffen wird und die direkt am
Biomolekül angreifenden Vorgänge (direkte Strah-
lenwirkung) demgegenüber zurücktreten. Er sprach
von "Wasseraktivierung", die auch als Radiolyse
des Wassers bezeichnet werden kann. Den dabei ent-
stehenden Radiolyseprodukten und hier wiederum dem
OH• - Radikal kommt bei der Entwicklung von Strah-
lenschäden eine große Rolle zu (132). Schematisch
kann man sich den Wasserradiolysevorgang wie folgt
vorstellen (entnommen aus 133) :





Die nach Reaktionsgleichung 2 entstehenden $\text{OH}^\bullet$ - Radikale haben eine hohe oxidative Potenz. Sie können im wesentlichen folgende Reaktionen eingehen (132) :

1. Elektronentransfer
2. Addition
3. Wasserstofftransfer

Sehr eindrucksvoll hat NAKKEN (83) die Bedeutung der $\text{OH}^\bullet$ - Radikale mit Hilfe von Radikalfängern wie Paraaminobenzoesäure (PABA) und Paraaminobenzoylglutamat (PABGA) unterstrichen und als Angriffspunkte für die Radikale aromatische Aminosäuren und SH- Gruppen der Membranproteine genannt. In ähnlicher Weise können sie auf die Desoxyribonukleinsäure (DNS) wirken, wo strahlendosisabhängige Einzel- und Doppelstrangbrüche beobachtet wurden (50), die durch Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen (137) und Strukturveränderungen an den Nukleotidbasen, um nur einige Vorgänge zu nennen, entstehen sollen (98, s.d. Literaturübersicht).

Als besonders strahlenempfindliche Stellen in Makromolekülen werden $-\text{C}=\text{C}-$ Doppelbindungen, Glykosid- und Wasserstoffbrückenbindungen (142) sowie das α - C- Atom der Polypeptidkette und die $-\text{S}-\text{S}-$ Brücken, aufgebaut durch Cystein und Cystin, in den Strukturproteinen der Membranen angegeben (48).

Bei der Verwendung des Begriffs der biologischen Membran wollen wir uns im folgenden an eine von USSING (138) gegebene funktionelle Definition halten, nach der es sich dabei um anatomisch

nachweisbare Grenzsichten handelt, die für gelöste Bestandteile eine Diffusionsbarriere darstellen. Es sind also nicht nur die die Zelle nach außen hin begrenzenden sondern auch die im Plasma befindlichen Membranen gemeint.

Als einige der wesentlichsten Angriffspunkte für ionisierende Strahlen werden vielfach die SH-Gruppen der Membranproteine hervorgehoben (6,62, 78,109,123). Alle diese Autoren lokalisieren sie an die äußere Oberfläche der Zellmembranen, was, je nach Zellart, allerdings nicht unumstritten ist (79,124).

Bestrahlt man biologische Objekte in reiner Sauerstoffatmosphäre, so stellt man fest, daß die benötigte Dosis, um gleiche Schäden wie unter Anoxie zu setzen, um bis zu einem Drittel reduziert werden kann (142). Sauerstoff hat also einen strahlensensibilisierenden Effekt auf biologische Einheiten. Dies wird auf molekularer Ebene einmal damit erklärt, daß in Anwesenheit von O_2 die Ausbeute aus der Wasserradiolyse an $H\cdot$ - und $OH\cdot$ - Radikalen größer wird (142), zum anderen aber ein unter Anoxie bestehender Schutz von Membranthiolen kaum oder gar nicht mehr zur Geltung kommen kann (23). RÉVÉSZ und LITTBAND (106) nehmen sogar an, daß auf einer höher organisierten Ebene, also etwa der Zelle, sich der Strahlenschaden unter Sauerstoffmilieu nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ verändert. So würde unter Anoxie die DNS des Zellkernes den Hauptangriffspunkt darstellen, während im Sauerstoffmedium eher die SH- Gruppen und damit die Membranproteine von der Schädigung betroffen seien. Dies läßt sich als weiteres Argument für die hervorragende Bedeutung der Sekundärreaktionen im Rahmen der Strahlenwirkung anführen (142).

Will man nun die Schädigung durch ionisierende Strahlung näher beschreiben, so kann man von der als sicher geltenden Tatsache ausgehen, daß zumindest in Anwesenheit von Sauerstoff (106) SH- Gruppen der Proteine in den Membranen oxidiert werden (109). Dabei können neue Disulfidbrücken entstehen und bereits bestehende zerstört werden. Die Konformation der Membranproteine verändert sich daraufhin und damit die gesamte Membranstruktur (6, 80, 109, 134).

Ebenso wie die schwefelhaltigen Gruppen der Proteine werden auch die ungesättigten Membranphosphatide durch oxidierende Radikale angegriffen (142). Da eine ihrer Aufgaben die Stützung der Proteinstruktur ist, müßten sich bei ihrer Zerstörung zwangsläufig wieder Veränderungen in der Proteinkonformation ergeben (26, 142). Ob die dabei auftretenden Lipidperoxide an der weiteren Entwicklung des Strahlenschadens beteiligt sind, oder ob sie, gewissermaßen als Nebenprodukt, erst dann entstehen, wenn das gesamte antioxidative Potential in der Membran durch die strahleninduzierten oxidierenden Radikale bereits aufgebraucht ist und sie somit in Dosisbereichen unter 50 krad keine Rolle spielen (78, 135, 149), ist nicht bis ins letzte geklärt. Einen Reparaturmechanismus eines solchen durch Lipidoxydation entstandenen Strahlenschadens kann man in der von EIBL (27) beschriebenen membranständigen Acyltransferase vermuten.

Weitere Möglichkeiten, wie sich eine Strahlenschädigung in der Membran auswirken könnte, wären in der Aktivierung von lysosomalen Enzymen (6) und der Zerstörung von aromatischen Aminosäuren in den Strukturproteinen (83) zu suchen, die zu

ähnlichen wie oben beschriebenen Strukturveränderungen der Membran führen.

1.2. Strahlenbedingte Funktionsänderungen an Biomembranen

Im Zuge der in Kapitel 1.1. dieser Arbeit beschriebenen chemischen Veränderungen in den Biomembranen lassen sich auch funktionelle Störungen nach Bestrahlung nachweisen. So wird die oben in der Definition der Biomembranen nach USSING (138) angesprochenen Eigenschaft als Diffusionshindernis für Ionen beeinträchtigt. Bestrahlte Zellen sind nämlich nicht mehr in der Lage, ihre normalen Na^+ - und K^+ - Ionengradienten beiderseits der Membran aufrechtzuerhalten. Dies ist besonders an erregbaren Zellen aus Nerven und Myokard, an Erythrocyten und Thymocyten untersucht worden (16, 96, 97, 122, 123, 135, 136). Auch klinisch-chemisch findet man solche Elektrolytverschiebungen bei Untersuchungen von Patientenserum während Strahlentherapie (60, 74, 87). Tracertechnische Beobachtungen mit ^{22}Na und ^{42}K haben für Nervenfasern von Tintenfisch, Maus und Frosch bestätigt, daß K^+ - Ionen während der Bestrahlung die Zellen verlassen, Na^+ - Ionen in sie einwandern (19, 70, 114, 136). Eine Erhöhung der Na^+ - Ionenpermeabilität fanden auch PORTELA et al. (88, 89, 90) für Muskelzellen und BREUER et al. (13) in der Milz von Ratten nach Ganzkörperbestrahlung.

Auf diese Elektrolytverschiebungen führt BERGEDER (8, 9, 10) die von ihm beobachteten Veränderungen der elektrischen Eigenschaften der Membranen p.r. zurück. Er sieht nämlich etwa parallel zum Absinken des Kaliumgehaltes des *M. sartorius* von Winterfröschen eine Senkung des durch diese

aufrechterhaltenen Membranpotentials, also eine Depolarisation der Membranen, eine Erhöhung der Reizschwelle gegen von außen gesetzte Reize und eine Steigerung der endogenen Erregungsbildung bei spontan depolarisierenden Strukturen im Herzen der Frösche. Ähnliche Befunde einer strahleninduzierten Depolarisation erhoben ESCH et al. (29) an der Algenzelle NITELLA und GAFFEY (39) am N. ischiadicus des Frosches, der gleichzeitig eine Verlängerung der relativen Refraktärzeit dieses Nerves p.r. beschreibt. GÜNTHER und HUG (49) konnten bei ihren 1974 angestellten Bestrahlungsversuchen an Schneckenneuronen von *Helix pomatia* ebenfalls solche Depolarisationen nachweisen, die sie mit der angewendeten Dosisleistung korrelierten, womit sie auf die Regenerationsfähigkeit und-geschwindigkeit dieser neuronalen Strukturen hinwiesen. Ebenso konnten sie die von BERGEDER (9) beschriebenen Stimulationen von biologischen Automatismen durch Röntgenstrahlen bestätigen. Sie maßen auch eine Abnahme des ohmschen Widerstandes der Membranen, den zuvor schon andere Autoren (40, 53, 111, 112) an *Nitella* festgestellt hatten.

An Erythrocyten (122, 123) und an Thymocyten (16) kann man Na^+ und K^+ - Ionenverschiebungen bereits nach wesentlich kleineren Strahlendosen (2 000 R) sehen als sie in den oben beschriebenen Versuchen verwandt wurden (50 - 300 kR). Für die Permeabilitätsveränderungen wird eine Hemmung des aktiven Transportes dieser Ionen diskutiert (123, 135). Dem stehen jedoch Beobachtungen gegenüber, daß strahleninduzierte Elektrolytverschiebungen bei 4°C , also dann, wenn aktive Transportvorgänge bereits zum Erliegen gekommen sind, größer sind als bei 37°C (78, 134, 142). Danach müßte man eher eine Reparaturfunktion durch diese aktiven Transportmechanismen

annehmen als ihre Beschädigung bei der Bestrahlung. Die Elektrolytwanderung müßte dann durch andere Strukturveränderungen in der Membran zustande gekommen sein. RINK (109) stellt hierzu für die Hefezelle zur Diskussion, daß die Änderung der Ionenpermeabilitätsverhältnisse durch Oxidation von Membranthiolen zu Sulfen-, Sulfin- und Sulfonsäuren entstehen könnte, die die negative Ladungsdichte in der Membran erhöhen und somit eine größere Kationenbeweglichkeit zur Folge hätte. Die oben erwähnte Abnahme des Membranwiderstandes (40,49, 53, 111, 112) würde eine solche Annahme unterstützen. CHAPMAN und STURROCK (16) hingegen schließen aus ihren Experimenten an Thymocyten, daß beide, sowohl der aktive Transport als auch die passive Ionenbeweglichkeit bei der Bestrahlung in Mitteleidenschaft gezogen werden. Sie nehmen an, daß in relativ niedrigen Dosisbereichen (200 - 4 000 R) vor allem der aktive Teil der Ionenbeweglichkeit betroffen ist, bei hohen Dosen (größer als 12 kR) hingegen der passive. Eine Bestätigung für die Beteiligung solcher aktiven Vorgänge am Strahlenschaden kann man auch in den Befunden von LEH DUK LIEU (68) sehen, der 1973, ebenfalls an Thymocyten, eine signifikante Hemmung der Membran-ATPase nach Bestrahlung mit Dosen größer als 500 R beobachtete. Einer solchen Membran-ATPase wird von vielen Autoren eine wesentliche Rolle im Transport von Na^+ - und K^+ -Ionen zugeschrieben (94, 115, 125, 127, 148). Einige Eigenschaften dieses Enzyms sollen nun im folgenden kurz beschrieben werden.

1.3. Eigenschaften einer Membran-Adenosintriphosphatase

Nachdem SKOU (125) 1957 eine Adenosintriphosphatase (im folgenden abgekürzt als ATPase)

in der Zellmembran von Nervenzellen der Krabbe nachweisen konnte, die mit dem aktiven Transport allgemein und dem Transport von Na^+ und K^+ - Ionen im besonderen in enger Verbindung zu stehen schien, ist dieses Enzym immer weiter in den Blickpunkt vieler Untersucher gerückt. Es zeigte sich im Laufe der Zeit, daß dieses Enzym, oder zumindest eng damit verwandte ATPasen, eine große klinische Bedeutung besitzen (130, 131). Dies ist vor allem in Herz, Gehirn, Niere, Schilddrüse, Auge und Gastrointestinaltrakt der Fall, in Organen also, in denen ein reger aktiver Transport herrscht.

Nähere Untersuchungen ergaben, daß das Enzym in seiner Aktivität abhängig von dem es begleitenden Ionenmilieu ist. Die wesentlichen Ionen dabei sind Na^+ , K^+ und Mg^{2+} (125). So wird die ATPase am aktivsten gefunden, wenn diese Kationen in folgenden Konzentrationen im Medium vorhanden sind : Mg^{2+} : 2mMol/l, Na^+ : 110 mMol/l, K^+ : 5 - 20 mMol/l (91, 92). Das pH-Optimum liegt bei pH 7,5. In diesem Zuge wurde auch festgestellt, daß es sich bei dem von SKOU (125) dargestellten Enzym um mindestens zwei Komponenten eines Systems handeln mußte. PORTIUS und REPKE (91, 92) fanden nämlich ein nur Mg^{2+} - abhängiges und ein weiteres Enzym, das zusätzlich durch Na^+ - und K^+ - Ionen aktivierbar war. Die Autoren wiesen an gleicher Stelle nach, daß diese beiden Komponenten zwei selbständige Enzyme und nicht etwa Untereinheiten eines einzigen sind.

Dem Na^+ - Ion fällt unter diesen drei Kationen eine besondere Rolle zu. Seine Konzentration soll es sein, die die Aktivität des Enzyms steuert (148).

Die Struktur der ATPase läßt sich wohl am besten mit der eines Lipidprotein- Komplexes beschreiben (72, 127, 146, 148). Dies steht sowohl mit ihrer vermuteten Lokalisation in der Plasmamembran (25, 38, 115, 140, 150) (präparativ Teil der Mikrosomenfraktion) als auch mit den Beobachtungen recht gut im Einklang, daß die Behandlung mit Phospholipase A und C die Aktivität des Enzyms erheblich senkt (127), eine nach ähnlicher Lipidextraktion erfolgte Substitution mit Phosphatidylserin den Aktivitätsverlust aber wieder bis zu einem gewissen Grade zu restaurieren in der Lage ist (146). Das Molekulargewicht des Enzyms wird im allgemeinen mit 500 000 angegeben (82, 148).

Eine sehr wesentliche Struktureigenschaft des Enzyms scheinen Sulfhydrylgruppen (im folgenden als SH- Gruppen abgekürzt) zu sein, die eine wichtige Rolle für die Aktivität spielen müssen, wie in Versuchen mit SH- Gruppen-Blockern wie z.B. p- Chlormercurobenzoeat (p- CMB) nachgewiesen wurde, die die ATPase hemmen (126, 127). Die Anzahl solcher SH- Gruppen wird von SENIOR (120) mit 8 je Molekül Enzym angegeben.

Die Aufgabe der ATPase, oder wohl besser des ATPase- Systems, wird darin gesehen, entgegen Konzentrationsgradienten Na^+ - und K^+ - Ionen in einem aktiven "Bergauftransport" durch die Zellmembran zu transportieren (127, 148). Dabei wird Energie verbraucht, die aus der Hydrolyse des energiereichen Substrates des Enzyms, Adenosintriphosphat (im folgenden als ATP abgekürzt), gewonnen wird. Es besteht eine stöchiometrische Beziehung zwischen verbrauchter Energie und transportierten Ionen.

Je Mol ATP können 3 Mole Na^+ - Ionen durch die Membran geschafft werden (43). Auch zwischen Na^+ - und K^+ - Ionen findet man ein solches Verhältnis : Für 3 Mole Na^+ - Ionen werden 2 Mole K^+ - Ionen transportiert (130).

Bei der Suche nach dem Funktionsmechanismus der ATPase konnte man ein phosphoryliertes Intermediat des Enzyms darstellen (4, 30, 73, 81, 94, 115, 147). Darunter ist ein Zwischenprodukt der ATP- Hydrolyse zu verstehen, das durch Phosphorylierung des Enzyms durch den endständigen Phosphatrest des ATP unter Mitwirkung von Na^+ - Ionen entsteht (4). Dieser Enzym- Phosphat- Komplex (E-P) soll danach unter Anwesenheit von K^+ - Ionen in Enzym und anorganisches Phosphat (P_i) gespalten werden (113) :



Mg^{2+} - Ionen sind nur beim ersten Schritt notwendig (113). SEN (119), der dieses Modell weiterentwickelt hat, beschreibt allerdings zwei Intermediatformen, die seiner Meinung nach durch Konformationsveränderung des Enzymproteins während der Biokatalyse ineinander übergehen. Dabei sollen Na^+ - Ionen die Konformation $\text{E}_1\text{-P}$ stabilisieren, während Mg^{2+} - Ionen die andere, $\text{E}_2\text{-P}$, begünstigen. Durch die Existenz dieser beiden Konformationen des Enzyms bzw. deren Ineinanderübergehen kann man sich den Transport von Na^+ - und K^+ - Ionen durch die Membranen als "Flip- Flop- System" vorstellen (94). Das von SCHATZMANN (115) 1965 entwickelte System eines phosphorylierten Carriers ließe sich ebenfalls hier einordnen.

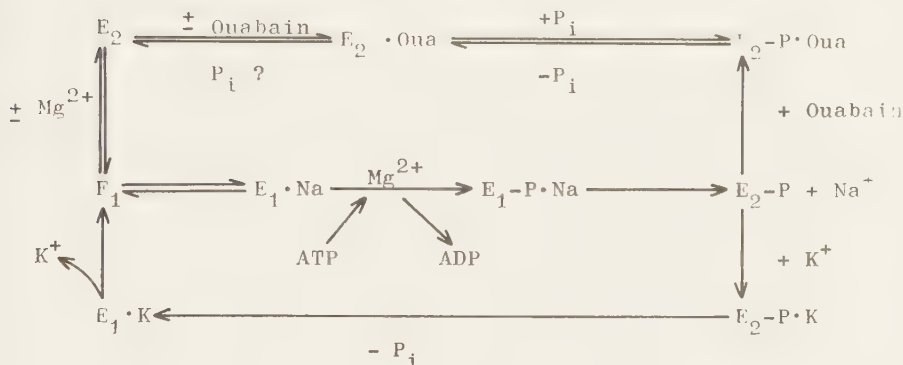
Wegen dieser hier beschriebenen Eigenschaften wird die Membran- ATPase, der die Transportfunktion für die Kationen Na^+ - und K^+ - zugeschrieben werden, als Mg^{2+} - abhängige, Na^+ - und K^+ - aktivierbare Adenosintriphosphatase EC 3.6.1.3, bezeichnet.

1.4. Wirkung von herzaktiven Glykosiden auf die Membran- ATPase

Eine bisher noch nicht besprochene Eigenschaft des Membran- ATPase- Systems ist seine Empfindlichkeit gegen herzaktive Glykoside (44, 64). Auch bei der Untersuchung dieses Teilaspekts bestätigt sich, daß wir mindestens zwei verschiedene Enzyme vor uns haben (91, 92). Die Na^+ - und K^+ - aktivierbare ATPase nämlich ist deutlich hemmbar durch Glykoside, während das nur Mg^{2+} - abhängige Enzym keine Wirkung zeigt (2). Die beobachteten Hemmeffekte lassen sich recht gut mit der positiv inotropen Wirkung dieser Pharmaka korrelieren, obwohl diese Auffassung nicht allgemein unumstritten bleibt (3, 15). AKERA et al. (2) geben einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,56$ bei $p < 0,05$ an.

Einen Hinweis darauf, daß die Membran- ATPase auch therapeutisch einen oder sogar den Glykosidrezeptor darstellt (102), finden verschiedene Autoren in folgenden Befunden : die festgestellten Lokalisationen beider scheinen gleich zu sein (128) ; es besteht eine Dosisabhängigkeit gleicher Art zwischen Herzglykosiden und positiv inotroper Wirkung einerseits und Membran- ATPase andererseits (12) ; man kann die bereits oben beschriebene Korrelation zwischen Hemmung des Enzyms und positiv inotroper Wirkung der Glykoside erstellen.

Für die Erklärung des Wirkungsmodus von Glykosiden mit ihrem Rezeptor Membran- ATPase bietet sich wiederum die Vorstellung von der Bildung eines phosphorylierten Intermediates des Enzymes an (28). SEN et al. (119) haben hierzu folgendes Modell entwickelt: +)



Sie nehmen dabei an, daß Glykoside die Stabilität des phosphorylierten Intermediates E₂-P erhöhen oder, wohl besser, die durch K⁺- Ionen begünstigte Hydrolyse von E₂-P hemmen oder verhindern. Sie gehen also dabei wie auch andere Autoren (4, 5, 12) von einer entweder durch Glykoside begünstigten oder hervorgerufenen Konformationsveränderungen des Enzyms (E₁ nach E₂ und wieder zurück nach E₁) aus. Durch diese nun andere Struktur ändern sich danach auch die spezifischen Bindungsstellen für Na⁺- Ionen, die dann nicht mehr oder nur noch beschränkt transportiert werden können, wodurch sich die intrazelluläre Na⁺- Ionenkonzentration langsam erhöht (12, 115). Diese vermehrte Anwesenheit von Na⁺- Ionen intrazellulär soll nun die Menge der frei im Plas-

+) Oua = Ouabain = Strophanthin G (WHO)

ma verfügbaren Ca^{2+} - Ionen erhöhen (12, 102), welche ihrerseits nach dem Prinzip der elektromechanischen Kopplung (116) die Kontraktionskraft des Herzmuskels steigern. Damit entstünde der positiv inotrope Effekt.

1.5. Fragestellung

Der Herzmuskel wurde lange als ein Strahlen gegenüber sehr widerstandsfähiges Gewebe angesehen, da man Dosen über 10 krad benötigte, um lichtmikroskopisch sichtbare Veränderungen hervorzurufen (118, 139, 145). Elektronenoptisch konnte man dann jedoch ultrastrukturelle Veränderungen nachweisen, die sich vor allem an den Mitochondrien abspielten. Man sah drei Formen der Reaktion dieser Zellorganellen auf die Bestrahlung. Die ersten beiden, nämlich eine Schwellung (110) und eine sogenannte "trübe Schwellung" (75, 76) sind als reversibel anzusehen, während die dritte, die Lysis (1), irreversibel ist. Manche Autoren (18, 46, 47) schreiben diesen Veränderungen der Mitochondrien eine wesentliche Schlüsselstellung in der Entwicklung der Strahlenschäden an der Zelle zu. Dies wird auch verständlich, wenn man bedenkt, welche wichtigen funktionellen Struktureinheiten in den Mitochondrien lokalisiert sind wie z.B. die Enzyme der Atmungskette, weswegen die Organelle auch als Kraftwerk der Zelle bezeichnet wird (121).

Auch die kontraktile Strukturen, die Myofibrillen, werden schon nach relativ geringen Strahlendosen (500 R) in Mitleidenschaft gezogen (85). KHAN (59) bringt diese Veränderungen mit Permeabilitätsstörungen und dadurch erfolgendem K^+ - Verlust der Zellen ursächlich in Verbindung.

FAJARDO und STEWART (31, 32, 33, 34) konnten licht- und elektronenoptisch zeigen, daß das gesamte funktionelle System des Herzmuskels durch Bestrahlung geschädigt wird. Sie bezeichneten die Veränderung als "akute Strahlenperikarditis", die in einer Spätphase (ab 70 Tage p.r.) unter gleichzeitig auftretender Schädigung des Gefäßsystems in eine Myokardfibrose übergeht.

Bei den hier beschriebenen Vorgängen handelt es sich um Spätveränderungen (70 Tage p.r.), denen Frühschäden, vor allem auf biochemischer Ebene, vorausgehen (96, 97, 98). Hierbei besonders wichtig scheinen die oben beschriebenen Verschiebungen im Elektrolythaushalt der Myokardzelle zu sein und dort wiederum die der Na^+ - Ionen, die stark in den aktiven Transport der Zellen mit einbezogen sind (148). Einen Hinweis auf solche Veränderungen konnten auch HERZER et al. (54) mit ihren Versuchen am Darm geben, die nach Bestrahlung mit 1 500 R dieses Gewebes Na^+ - Ionen- und Wassertransportstörungen (52, 55, 56) fanden und diese mit einem vollständigen Verlust der ATPase-Aktivität der Dünndarmwandzellen in Verbindung bringen konnten.

Da, wie bereits in Kapitel 1.3. dieser Arbeit beschrieben, die Mg^{2+} - abhängige, Na^+ - und K^+ - aktivierbare Adenosintriphosphatase, EC 3.6.1.3., einen wesentlichen, wenn nicht überhaupt den aktiven Teil des Transportsystems für Na^+ - und K^+ - Ionen durch Plasma- und Zellmembranen auch der Myokardzelle darstellt (43, 94, 115, 125, 127, 130, 131, 148) und ein wichtiger Bestandteil dieses Enzyms SH- Gruppen sind (120, 126, 127), die als äußerst strahlensensibel gelten (62, 78, 109, 123),

führt dies zu der Frage, wie sich das Enzym unter Bestrahlung mit Röntgenstrahlen in einem Dosisbereich von 250 - 5 000 R verhält. Fände man eine Hemmung, so könnte man sich dadurch zumindest teilweise die nach Bestrahlung von Myokardzellen auftretenden Na^+ - und K^+ - Ionenverschiebungen (16, 96, 97) erklären und auch die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen damit in Verbindung bringen.

Die ATPase gilt außerdem als der Angriffspunkt für herzwirksame Glykoside an der Zellmembran (2, 44, 102). Es konnte bereits von BESCH et al. (12) eine enge Korrelation zwischen Hemmung des aktiven Transportes einerseits und der ATPase andererseits belegt werden. CHAPMAN und STURROCK (16) haben 1972 am Beispiel von bestrahlten Thymocyten und hier gefundenen K^+ - Ionenverschiebungen durch die Zellmembran sowohl nach Bestrahlung allein als auch nach Zugabe von Ouabain als Vertreter der Glykosidgruppe, sowie nach gleichzeitiger Anwendung von Bestrahlung und Ouabain so ähnliche Ergebnisse erhalten, daß sie eine additive Wirkung beider und sogar einen gleichen Angriffspunkt vermuteten.

Eine Hemmung der ATPase- Aktivität durch Glykoside und, wie hier zu untersuchen sein soll, durch Bestrahlung in Verbindung mit der von BESCH et al. (12) gefundenen Korrelation zwischen aktivem Transport und ATPase- Aktivität konnte einen weiteren Hinweis darauf liefern, ob bei strahleninduzierten Elektrolytverschiebungen an Zellmembranen, wie bereits diskutiert (123, 135), ein aktiver Vorgang eine Rolle spielt oder es sich dabei um durch Membranstrukturveränderungen hervorgerufene

nur passive Verschiebungen handelt (78, 142).
Daher soll ein weiterer Punkt der hier anzustellen-
den Betrachtung sein, ob der Einfluß von herz-
aktiven Glykosiden und Bestrahlung auf die Mg^{2+} -
abhängige, Na^{+} - und K^{+} - aktivierbare ATPase ähnlich
ist und man eine Additivität der Wirkungen beobach-
ten kann, die dann deutlicher auf einen eventuellen
gemeinsamen Angriffspunkt beider Behandlungen
schließen ließe.

2. METHODEN

2.1. Vorbemerkungen

Die hier zu untersuchende ATPase ist ein Enzym der Plasmamembranen (7, 41, 57, 127, 140, 141), die man präparativ in der Mikrosomenfraktion homogenisierter Zellen nachweisen kann. Die Zugehörigkeit der ATPase zu den Membranen ist auch elektronenmikroskopisch gezeigt worden (91, 150).

Will man die ATPase darstellen, so muß man durch Homogenisation und fraktionierte Zentrifugation die Mikrosomen präparieren. Es muß dabei aber als Schwierigkeit beachtet werden, daß in einer solchen Präparation immer auch Mitochondrienfragmente enthalten sind (7), die sich im hier vorliegenden Falle besonders störend auswirken könnten, da sie eine ATPase enthalten, die teilweise gleich, teilweise aber auch wesentlich anders reagiert als die gesuchte (91, 92) und somit die Ergebnisse verfälschen würde. Es wurde daher bei der Auswahl der Präparationsmethode weniger Wert darauf gelegt, einen hohen Aktivitätskoeffizienten zugunsten des Na^+ - und K^+ -aktivierbaren Enzyms gegenüber der allein Mg^{2+} -abhängigen ATPase zu erhalten, als vielmehr einen möglichst großen Grad an Mitochondrienfreiheit der Mikrosomenfraktion zu erreichen.

Die aufgrund dieser Überlegungen gewählte Methode ist die von FRICKE 1970 und zusammen mit KLAUS 1971 beschriebene (36, 37). Sie scheint der Forderung nach Mitochondrienfreiheit recht gut gerecht zu werden, da die Autoren angeben,

in ihrer Mikrosomenfraktion nur etwa 8 % der Aktivität des Mitochondrienindikatorenzyms Succinatdehydrogenase zu finden wie in der Mitochondrienfraktion selbst. Daneben ist der Aktivitätsquotient (Na^+ - und K^+ - aktivierbare / allein Mg^{2+} -abhängige Aktivität) mit 0,65 bzw. 0,80 nach 22 Tagen Alterung der Präparation relativ günstig.

2.2. Darstellung einer mikrosomalen, Mg^{2+} -abhängigen, Na^+ - und K^+ - aktivierbaren Adenosintriphosphatase

Als Versuchstiere wurden weibliche Meer-schweinchen verwandt, deren Körpergewicht 300 g nicht unter- und 600 g nicht überschreiten sollte. Auf diese Weise erhielt man eine relativ geringe Schwankung eines durchschnittlichen Herzkammergewichtes nach Säuberung von $0,8 \pm 0,1$ g.

Die Tiere wurden mittels Nackenschlag getötet, die Herzen sofort mit der Schere entfernt, in flüssiger Luft eingefroren und etwa 20 - 24 h bei -20°C aufbewahrt. Die so gelagerten Herzen wurden bei Zimmertemperatur wieder vorsichtig aufgetaut, noch daran verbliebenes Bindegewebe, größere Gefäße und die Vorhöfe entfernt, die Ventrikel aufgeschnitten und das darin befindliche Blut mit Filterpapier abgetupft. Nach Bestimmung des Feuchtwichtes auf einer Waage wurden die Herzen in eiskalte Saccharose- EDTA- Lösung (Bestandteile in mMol/l : Saccharose 250; Di-Na-EDTA 2; mit Trislauge auf pH 7,0 eingestellt) verbracht und mit einem Ultra-Turrax (Typ TP 18-10) 1 Minute lang homogenisiert. Dieses Homogenat wurde dann so mit obiger Saccharose-EDTA- Lösung verdünnt, daß, bezogen auf das Feuchtwicht,

ein 10 %iges (W/V) entstand, das nun in einem Handhomogenisator aus Glas (FA. KOBE, Marburg) nochmals 2 Minuten homogenisiert wurde. Bei allen diesen und folgenden Arbeitsgängen mußte im Eisbad eine Temperatur von + 4°C eingehalten werden. Das Handhomogenat befreiten wir anschließend durch Filtrieren durch eine zweifache Mullschicht von groben Rückständen.

Hieran schlossen sich folgende Zentrifugationsschritte an, die wir in einer kühlbaren (+ 4°C) Zentrifuge von Typ MSE "Highspeed 18", Rotor 6 x 100 ml nach FRICKE (36, 37) durchführten :

1. Filtriertes Handhomogenat 10 min bei
3 000 Upm = 600 x g
2. Im Handhomogenisator aufhomogenisierte
und mit eiskalter Saccharose- EDTA-Lösung
auf gleiches Volumen wie in 1. (ca.
200 ml) gebrachte Rückstände 10 min
bei 3 000 Upm = 600 x g

Schritt 1. und 2. dienten der Abtrennung der Kernmembranfraktion.

3. Überstände 1 und 2, vereinigt und auf
320 ml verdünnt, 5 min bei 8 300 Upm =
8 000 x g

Hier erfolgt die Sedimentation der Mitochondrien.

4. Überstand 3, verdünnt auf 320 ml, 60 min
bei 17 000 Upm = 34 000 x g

Bei dieser letzten Zentrifugation sedimentierten die Mikrosomen.

Alle angegebenen Zentrifugationszeiten rechneten wir ab Zeitpunkt des Erreichens der geforderten Umdrehungszahl.

Der Rückstand aus Zentrifugation 4 wurde wieder in Saccharose- EDTA- Lösung, pH 7,0, aufgenommen, kurz im Handhomogenisator aufhomogenisiert (zur besseren Suspensierung) und eine Proteinbestimmung in dieser Suspension durchgeführt. Dies geschah nach der Biuret-Methode. Die Proteinkonzentration des Präparates stellten wir danach mit der Saccharose- EDTA- Lösung auf 5 mg/ml ein und hielten sie bei - 2°C im Kühlschrank für 6 Tage, um einen höheren Aktivitätsquotienten (s. S. 19) zu erhalten (36). Nach Ablauf dieser 6 Tage füllten wir die Proben in Kunststoffbehälter zu je 1 ml ab und froren sie bei - 15°C ein. Bei dieser Temperatur können sie nach FRICKE (36) bis zu 3 Monaten ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

2.3. Messung der Enzymaktivität

Auch die Bestimmung der Enzymaktivität wurde nach der Beschreibung von FRICKE (36, 37) durchgeführt. Sie wird über den Substratumsatz des Enzyms



aus dem anfallenden anorganischen Phosphat P_i gemessen. Dies ist möglich, da der Anteil von anorganischem Phosphat P_i , aus der Umsetzung



entstehend, außerordentlich gering angegeben wird (140). Da im vorliegenden Falle jedoch zwei Enzyme an der Reaktion beteiligt sind, nämlich die allein Mg^{2+} - abhängige und die Na^+ - und K^+ - aktivierbare ATPase, ist es nötig, auch zwei

Bestimmungsansätze zu machen :

1. Messung der Aktivität in Anwesenheit von Na^+ -, K^+ - und Mg^{2+} - Ionen, im folgenden "Gesamtaktivität genannt;
2. Messung der Aktivität nur in Anwesenheit von Mg^{2+} - Ionen, im folgenden "Basalaktivität" ;

Als Differenz aus diesen beiden erhält man die Aktivität des Na^+ - und K^+ - aktivierbaren Anteiles, der hier aus in Kapitel 1.1. dieser Arbeit angestellten Überlegungen wie bei FRICKE (36, 37, 38) "Transportaktivität" genannt werden soll.

Die Bestimmung der Gesamtaktivität erfolgte in folgendem Medium :

2 mMol/l MgCl_2
80 mMol/l NaCl
16 mMol/l KCl
80 mMol/l Imidazol - HCl - Puffer, pH 7,1
Proteinkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$
Gesamtvolumen 0,5 ml

Der Meßansatz für die Basalaktivität enthielt das Entsprechende ohne Na^+ - und K^+ - Ionen.

Die Umsetzung starteten wir durch Zugabe von 50 μl Tris- ATP, wobei sich eine ATP- Endkonzentration im Medium von 2 mMol/l ergab. Inkubiert wurde 20 Minuten lang bei 37°C im Wasserbad, danach die Reaktion mit 2 ml 5 %iger Trichloressigsäure (TCA) beendet.

Den Gehalt an anorganischem Phosphat bestimmten wir nach der Methode von MARSH (71) auf photometrischem Wege in einem Spektrallinien-Photometer der Fa- ZEISS Typ M 4 Q 2 mit UV - Zusatzgerät PMQ 2 bei 310 nm, das in entsprechenden Vorversuchen mit einem P_i - Standard geeicht wurde. Es zeigte sich, daß in dem Meßbereich, der hier benötigt wurde, die Eichkurve einen linearen Verlauf annahm. Der Korrelationskoeffizient zwischen P_i - Konzentration und gemessener Extinktion berechnete sich für den Konzentrationsbereich von 0,5 - 15 $\mu\text{g } P_i/\text{ml}$ zu $r = 0,993$. Die in $\mu\text{g } P_i/\text{ml}$ erhaltenen Werte wurden in $\mu\text{Mol } PO_4/\text{mg Prot.}/\text{h}$ umgerechnet und im folgenden so angegeben.

Um Verfälschungen der Ergebnisse entgegenzuwirken, mußten bei jeder Bestimmung für Basal- und Gesamtaktivität je zwei Blindwerte mitgeführt werden, die ähnliche Zusammensetzung hatten wie oben:

Blindwert I.:

Reagentien + Enzym ohne ATP

Blindwert II.:

Reagentien ohne Enzym mit ATP

Die hierbei bestimmten P_i - Werte wurden von den entsprechenden der Versuchsansätze subtrahiert und somit rechnerisch die nicht durch Enzymumsetzung entstandenen Phosphatanteile eliminiert.

2.4. Bestrahlung und herzaktive Glykoside

Jede Versuchsgruppe bestand aus 20 Tieren.

Sie wurden in Äthernarkose, die etwa 10 - 15 Minuten anhielt, bestrahlt. Die Narkose übte keinen Einfluß auf die gefundenen Werte der Transport-ATPase aus (s.a. Ergebnisteil). Für die Bestrahlung verwandten wir ein Gerät des Typs MÜLLER RT 100, 85 kV, 8 mA, Filter 1,25 mm All Rundtubus 2,5 cm Durchmesser, Dosisleistung 1000 R/min, Abstand 10 cm. Die in den Tabellen und Abbildungen angegebenen Dosen sind Herddosen (HD). Sie ergeben sich aus den applizierten Oberflächendosen (OD) aufgrund der angegebenen Apparatekonstanten und Bestrahlungsverhältnisse so, daß $HD = 50 \% OD$ gilt. Zwischen Beendigung der Bestrahlung und Tötung der Tiere verging, wenn nicht anders angegeben, eine Zeit von 30 Minuten.

Die verwendeten herzaktiven Glykoside Digitoxin und k-Strophanthidin wurden aufgrund ihrer relativ schlechten Wasserlöslichkeit in Äthanol gelöst. Dies geschah zunächst in 90 %igem Äthylalkohol, der dann zu einer 9 %igen Lösung verdünnt wurde. Entsprechende Kontrollversuche ergaben, daß das Lösungsmittel keinen Einfluß auf die Enzymaktivität ausübte (s. Ergebnisteil).

Die benutzten Cardenolidkonzentrationen wurden aus der Dissertation FRICKE (36) in Übereinstimmung mit eigenen Vorversuchen (s. Ergebnisteil) so entnommen, daß sie etwa einer dort verwandten inotropen Effektdosis von 50 % (ID_{50}) entsprachen. Es ergaben sich so Endkonzentrationen in den Ansätzen $2,5 \times 10^{-7}$ Mol/l für Digitoxin und 2×10^{-5} Mol/l für k-Strophanthidin. Für Digitoxin wurde außerdem eine Konzentration von 5×10^{-7} Mol/l eingesetzt, was einer ID_{70} entspricht. Alle diese Effektdosen gelten nur für eine herrschende K^{+} -Ionenkonzentration

von 16 mMol/l. Die Dosiswirkungskurve für Digitoxin und Transport-ATPase entstand unabhängig davon (s. Ergebnisteil). Die Steroide wurden jeweils den entsprechenden Bestimmungsansätzen nach Kapitel 2.3. dieser Arbeit ohne Vorinkubation zugesetzt.

2.5. Materialien

Zum Ansetzen der zur pH- Einstellung der Saccharose- EDTA- Lösung verwandten Tris-Lauge benutzten wir Trisma- Base (SIGMA Nr. T 1503). Das Tris- ATP bezogen wir ebenfalls von SIGMA (Nr. A 3877). Die Proteinbestimmung nach der Biuret-Methode führten wir mit der BIOCHEMICA- Test- Kombination Nr. 15899 ("Gesamteiweiß") der Fa. BOEHRINGER, Mannheim, durch. Der BIOCHEMICA- Test- Kombination Nr. 15620 ("Phosphor und Phosphatide in Serum und Urin") wurde die zur Eichkurvenaufnahme der Phosphorbestimmung nach MARSH (71) verwendete Phosphatstandardlösung entnommen. Die herzwirksamen Steroide bezogen wir von der Fa. MERCK, Darmstadt: Digitoxin (MERCK 3044) und k-Strophanthidin (MERCK 7890). Alle übrigen verwandten Reagentien erhielten wie ebenfalls dorthier; sie wiesen alle p.a.- Qualität auf.

2.6. Statistik

Die Angabe der Werte in den Abbildungen und Tabellen erfolgt als Mittelwert $\pm$ mittlere Abweichungen des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s\bar{x}$). Die statistische Auswertung wurde über einen paarweisen Mittelwertvergleich mit Hilfe des homogenen t-Testes durchgeführt. Die Variablen können als normalverteilt gelten. In den Tabellen wurden immer die entsprechenden p- Niveaus angegeben,

auf denen gerade noch Signifikanz zu finden war. Als Vertrauensgrenze für einen signifikanten Unterschied nahmen wir $p < 0,05$ an. Wird diese überschritten, so ist dies durch 'n.s.' (nicht signifikant) gekennzeichnet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Abhängigkeit der Strahlenwirkung von der applizierten Strahlendosis

Mißt man die Aktivität der Transport- ATP-ase 30 Minuten nach lokaler Bestrahlung, so stellt man fest, daß sie deutlich dosisabhängig gehemmt wird (Abb. 1.). Bereits nach einer Dosis von 250 R (Herddosis) fällt eine leichte Hemmung auf. Bei einer mittleren Dosis von 1 500 R zeigt die Enzymaktivität nur 40 % der Kontrollen. Das Maximum der Hemmung, etwa 70 %, wird bei 3 000 R erreicht. Eine weitere Dosissteigerung auf 5 000 R Herddosis, die einer Oberflächendosis von 10 000 R entspricht (s. Kapitel 2.4. dieser Arbeit), bringt keinen weiteren Effekt.

Die Betrachtung aller gemessener Aktivitäten also Gesamtaktivität, Basalaktivität (Tab. 1.) und Transport- Aktivität (Abb. 1.) zeigt, daß die Hemmung hauptsächlich zu Lasten der Transport- und Gesamtaktivität geht. Ebenso erweist sich aber, daß auch die allein Mg^{2+} - abhängige ATPase in ihrer Aktivität dosisabhängig durch die Röntgenbestrahlung beeinträchtigt wird. (Signifikanzniveaus $p < 0,025$ und $p < 0,005$, Tab. 1.)

Im Methodikteil 2.4. dieser Arbeit wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Versuchstiere während der Bestrahlung in Äthernarkose schliefen und sich dies nicht auf die Enzymaktivität auswirkte. Um dies nachzuweisen, untersuchten wir bei einer zusätzlichen Gruppe von Tieren ($n = 15$), die wir 10 Minuten in Äthernarkose hielten und 30 min nach Abklingen der Narkose zur Enzymbestimmung töteten, die Transportaktivitäten und

fanden, daß sie sich durch die Behandlung nicht änderten ($11,31 \pm 0,68 \mu\text{Mol PO}_4 / \text{mg Prot.} / \text{h}$ nach Narkose und $11,94 \mu\text{Mol PO}_4 / \text{mg Prot.} / \text{h}$ bei Kontrolltieren, $n = 30$).

3.2. Einwirkung von Röntgenstrahlen und herzaktiven Glykosiden

Die in Abb. 2. dargestellte Dosiswirkungskurve für Digitoxin und Transport-ATPase diente als Vorversuch zur Bestimmung der unten verwendeten Digitoxinkonzentrationen und dem Vergleich unserer Digitoxincharge zu den in der Dissertation von FRICKE (36) verwandten. Als interessant stellte sich hierbei heraus, daß die Transport-ATPase, die im allgemeinen als hemmbar durch herzaktive Glykoside beschrieben wird (2, 10, 26, 28, 37, 75), durch sehr niedrige Konzentrationen (10^{-11} - 10^{-9} Mol/l etwas aktiviert werden kann. Darauf weist FRICKE (36) bereits für g- und k-Strophanthin hin, nicht aber für Digitoxin. Eine echte Hemmwirkung für die Transport-ATPase wird aber wohl erst ab einer Konzentration von 5×10^{-9} Mol/l sichtbar. Die inotropen Effektdosen, die FRICKE (36) fand, bestätigen sich in etwa : $2,5 \times 10^{-7}$ Mol/l = 40 %, $5,0 \times 10^{-7}$ Mol/l = 80 % Hemmung der Transport-ATPase.

Abb. 3 zeigt die Effekte bei gleichzeitiger Einwirkung von Röntgenstrahlen (250 R, 500 R) und $2,5 \times 10^{-7}$ Mol/l Digitoxin. Es wird sichtbar, daß Cardenolid und Bestrahlung gemeinsam eine stärkere Aktivitätshemmung der Transport-ATPase hervorrufen als jede für sich allein. Diese Veränderungen sind deutlich signifikant : Für 250 R und 500 R gilt jeweils $p < 0,005$.

Rein rechnerisch läßt sich eine Additivität der Effekte nachweisen:

2,5 x 10 ⁻⁷ Mol/l Digitoxin	41,4 %
250 R Röntgenstrahlen	17,9 %
Summe	59,3 %
2,5 x 10 ⁻⁷ Mol/l Digitoxin und 250 R Röntgenstrahlen	62,2 %

Dasselbe für eine Strahlendosis von 500 R (41,5 %) ergibt:

Summe	82,9 %
2,5 x 10 ⁻⁷ Mol/l Digitoxin und 500 R Röntgenstrahlen	76,1 %

(Die Prozentzahlen geben Hemmung der Transport-ATPase- Aktivität gegenüber Kontrollgruppen an)

Betrachtet man die dazugehörige Tab. 2., so erkennt man, daß die Veränderung der Gesamtaktivität auf 2,5 x 10⁻⁷ Mol/l Digitoxin lediglich durch die oben beschriebene Transportaktivitätsminderung zustande kommt, da die Basalaktivität sich nicht signifikant verändert. Dies stimmt mit Ergebnissen aus der Literatur überein (2, 91, 92). Zu vermerken ist, daß Digitoxin auf die durch Bestrahlung mit 250 R gehemmte Mg²⁺- abhängige ATPase einen aktivierenden Effekt auszuüben scheint (p < 0,005), was allerdings einer genaueren Abklärung bedürfte. Etwas ähnliches deutet sich auch, wenn auch nicht signifikant, bei einer Dosis von 500 R an.

In der Abb. 4. ist der gleiche Versuch mit einer etwa halbmaximalen Effektdosis (36) k- Strophanthidin von 2,0 x 10⁻⁵ Mol/l dargestellt. Auch

hier bleibt die Basalaktivität unverändert; ein stimulierender Effekt, wie für Digitoxin vermutend beschrieben, läßt sich nicht erkennen (Tab. 3.). Die Gesamt- und Transportaktivität reagieren bei 250 R ($p < 0,005$) und 500 R ($p < 0,01$) in Anwesenheit von k-Strophanthidin ähnlich wie unter Digitoxin. Bei einer Dosis von 1 500 R kann man jedoch keine signifikanten Änderungen durch k-Strophanthidin dieser Konzentration gegenüber der nur bestrahlten Gruppe mehr beobachten. Bei dieser Dosis ist mit 60 % Hemmung (s. 3.1.) bereits fast das erreichbare Maximum an Hemmwirkung (3 000 R hemmen 70 % der Aktivität) erreicht, so daß eine zusätzliche Behandlung mit k-Strophanthidin kaum noch eine Effektsteigerung hervorrufen kann. Daraus, daß bei maximaler Anwendung eines Hemmers der andere keine Wirkung mehr zeigt, kann man Rückschlüsse darauf ziehen, daß erstens eine wie oben schon rechnerisch vermutete Additivität bei der tatsächlich besteht und zweitens beide Hemmreaktionen am gleichen Ort angreifen.

Die Cardenolide mußten wegen ihrer schlechten Wasserlöslichkeit in 90 %igem Äthanol gelöst werden, wie in Kapitel 2.4. dieser Arbeit angesprochen. In unseren Bestimmungsansätzen wird dadurch eine Äthanolendkonzentration von 0,1-0,2 % (V/V) erreicht. Um störende Einflüsse des Alkohols auszuschließen, wurde die Transport-ATPase-Aktivität allein in 0,2 %iger Äthanol-Lösung bestimmt. Es ergaben sich keine Beeinträchtigungen der Aktivität durch das Lösungsmittel:

Aktivität der Transport-ATPase mit Äthanol
 $11,81 \pm 1,28 \mu\text{Mol PO}_4/\text{mg Prot.}/\text{h}$ ($n = 10$) gegenüber
 $11,94 \pm 0,78 \mu\text{Mol PO}_4/\text{mg Prot.}/\text{h}$ bei den

Kontrollen (n = 30).

3.3. Verhalten des ATPase- Systems bis 24 Stunden nach der Bestrahlung

Um beurteilen zu können, wie sich die Bestrahlung längerfristig auf das ATPase- System auswirkt, wurde es nach Bestrahlung mit 1 500 R (Herddosis) bis zu 24 Stunden p.r. untersucht. Abb. 5. macht deutlich, daß der Strahlenschaden schon unmittelbar nach der Bestrahlung (30 min) sehr groß, vielleicht sogar auf Dauer am größten zu sein scheint. Schon 1 Stunde p.r. kommt es zu einer beginnenden Restitution der Aktivität der Transport- ATPase, die nach 4 Stunden deutlich die Kontrollwerte übersteigt ($p < 0,0025$). Der Vier- Stunden- Wert bildet zugleich einen Gipfel, ab dem sich die Aktivität wieder kontinuierlich abfällt und bei 15 Stunden ($p < 0,0005$) und 24 Stunden ($p < 0,0005$) eine starke, dem 30- Minuten- Wert angenäherte Minderung aufweist.

Auch die Basalaktivität machteinen ähnlichen Anstieg durch, der seinen Gipfel aber erst 15 Stunden nach der Bestrahlung erreicht. (Tab. 4.). Sie erlangt sogar wesentlich höhere Werte als die Transportaktivität (Maximalaktivität der Basal- ATPase, 15 h p.r. : $22,04 \mu\text{Mol PO}_4 / \text{mg Prot.}/\text{h}$ gegenüber Maximum der Transport- Aktivität, 4 h p.r. : $16,10 \pm 0,27 \mu\text{Mol PO}_4 / \text{mg Prot.}/\text{h}$) und fällt auch erst viel später wieder ab als diese (24 - Stunden- Wert). Die Gesamtaktivität hat aufgrund des früheren und stärkeren Abfalls der Transport- Aktivität nach 24 Stunden fast wieder ihre Ausgangswerte erreicht. Das hier beobachtete

unterschiedliche Verhalten von Transport- und Basal- ATPase in der Zeit ist ein neuerlicher Hinweis für die von PORTIUS und REPKE (91,92) behauptete Eigenständigkeit beider Enzyme.

3.4. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

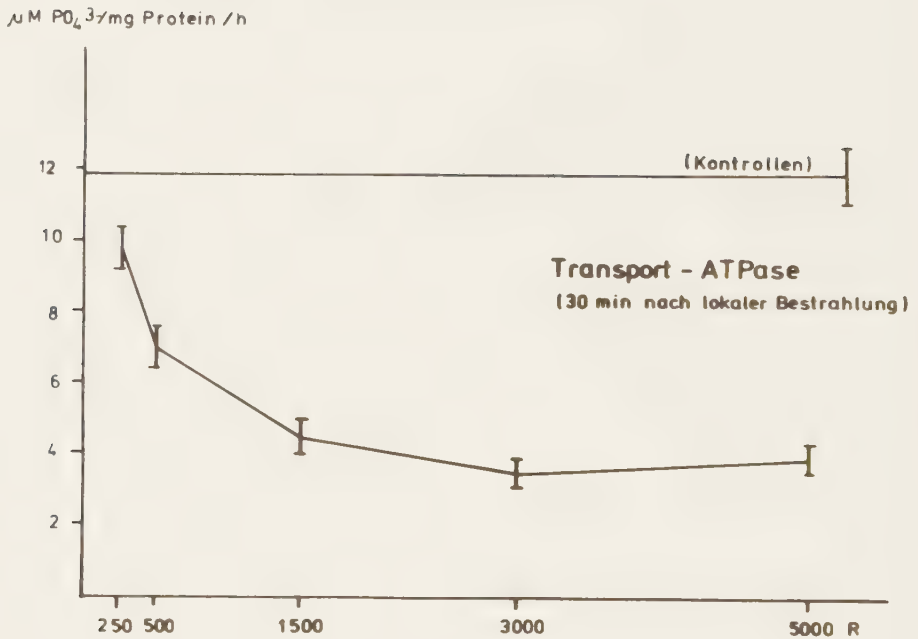


Abb. 1 : Transport-ATPase ($\mu\text{M PO}_4^{3-} / \text{mg Protein} / \text{h}$)
von Meerschweinchen-Herzventrikeln 30 min nach
lokaler Bestrahlung (Dosisabhängigkeit)

	n	Gesamt-Aktivität	Basal-Aktivität	s
Kontrollen	30	19,8338 ± 0,9509	7,8729 ± 0,5970	
250 R	19	14,0645 ± 0,5623	4,2632 ± 0,5437	p < 0,0005
500 R	22	13,0069 ± 0,7515	6,0217 ± 0,5466	p < 0,025
1500 R	20	7,2673 ± 0,5770	2,8009 ± 0,3062	p < 0,0005
3000 R	21	6,7911 ± 0,5048	3,4966 ± 0,3155	p < 0,0005
5000 R	20	6,3650 ± 0,6200	4,5042 ± 0,5450	p < 0,0005

Tab. 1 : Gesamt- und Basal-Aktivität der ATPase ($\mu\text{M PO}_4^{3-}$ / mg Protein / h) von Meerschweinchenherzen 30 min nach lokaler Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ mittlere Fehler der Mittelwerte. Die Angaben der Signifikanzen bezieht sich auf die Basal-Aktivität

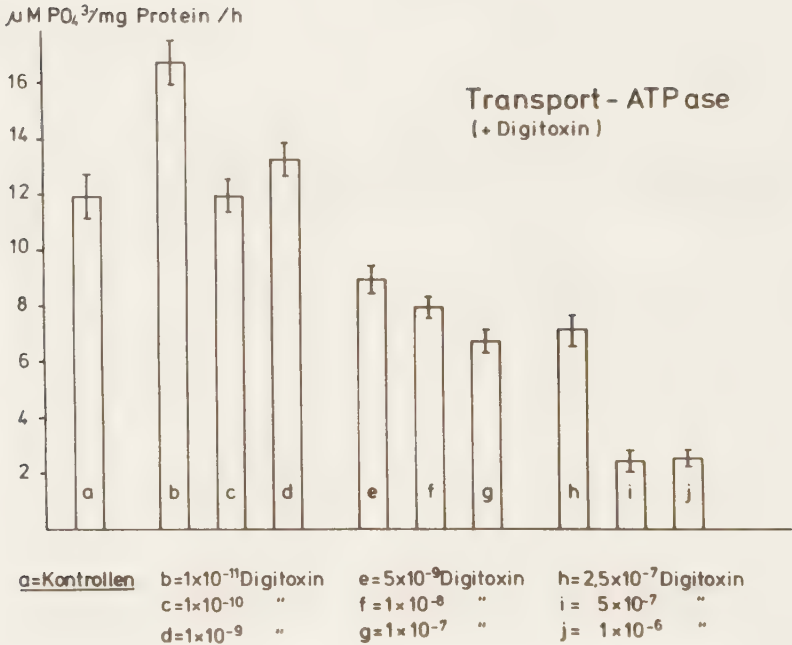


Abb. 2 : Transport-ATPase ($\mu\text{M PO}_4^{3-} / \text{mg Protein / h}$)
von Meerschweinchen-Herzventrikeln in Abhängig-
keit von der applizierten Digitoxindosis (in-
vitro-Versuch)

$\mu\text{MPO}_4^{3-}/\text{mg Protein/h}$

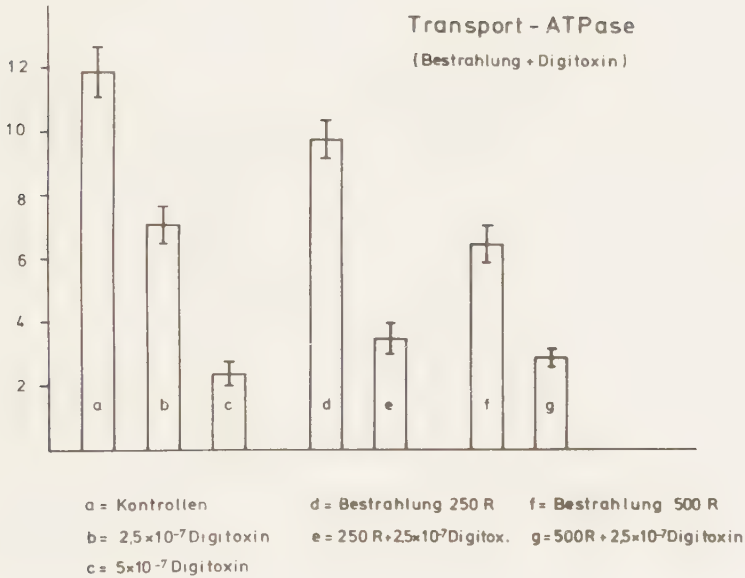


Abb. 3 : Einfluß von $2,5$ und 5×10^{-7} M Digitoxin auf die Transport-ATPase. Ferner strahlenbedingte Hemmung der (Na^+ und K^+)-ATPase (30 min nach lokaler Bestrahlung mit 250 und 500 R) und zusätzlicher Effekt von $2,5 \times 10^{-7}$ M Digitoxin.

	n	Gesamt-Aktivität	Basal-Aktivität	s
Kontrollen	30	19,8338 ± 0,9509	7,8729 ± 0,5970	] n.s. p < 0,0005
Kontrollen + 2,5 x 10 ⁻⁷ Digitoxin	21	16,0776 ± 2,2973	9,0841 ± 1,9986	
Kontrollen + 5 x 10 ⁻⁷ Digitoxin	15	5,7533 ± 0,6803	3,3308 ± 0,5160	
250 R	19	14,0645 ± 0,5623	4,2632 ± 0,5437	] p < 0,0005
250 R + 2,5 x 10 ⁻⁷ Digitoxin	17	14,4482 ± 0,9485	9,9302 ± 0,6290	
500 R	22	13,0069 ± 0,7515	6,0217 ± 0,5466	] n.s.
500 R + 2,5 x 10 ⁻⁷ Digitoxin	13	9,5500 ± 0,6669	6,6966 ± 0,6741	

Tab. 2: Einfluß von 2,5 und 5 x 10⁻⁷M Digitoxin auf die Gesamt- und Basal-Aktivität der ATPase (µMol PO₄³⁻ / mg Protein / h) von Meerschweinchenherzen, ferner strahlenbedingte Beeinflussung beider Parameter (30 min nach lokaler Bestrahlung mit 250 und 500 R) und zusätzlicher Effekt von 2,5 x 10⁻⁷M Digitoxin. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Werte der Basal-Aktivität.

$\mu\text{MPO}_4^{3-}/\text{mg Protein/h}$

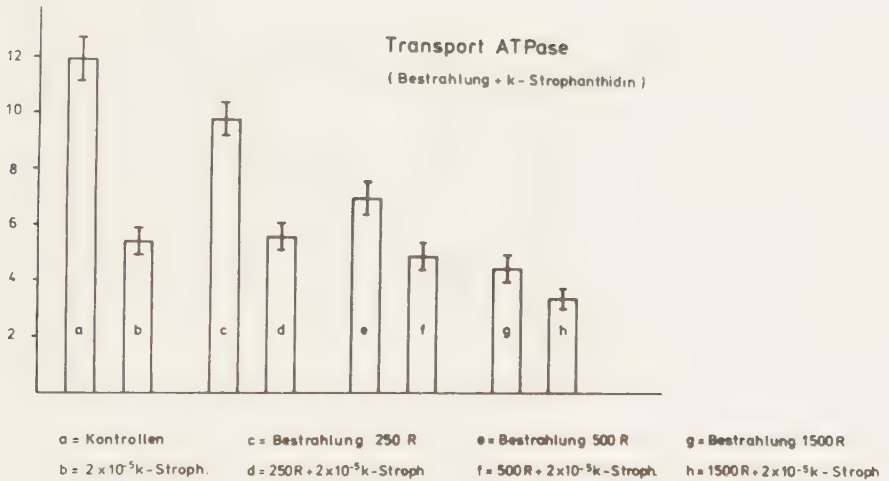


Abb. 4 : Einfluß von 2×10^{-5} M k-Strophanthidin auf die Transport-ATPase. Ferner strahlenbedingte Hemmung der $(\text{Na}^+$ und $\text{K}^+)$ -ATPase (30 min nach lokaler Bestrahlung mit 250, 500 und 1 500 R) und zusätzlicher Effekt von 2×10^{-5} M k-Strophanthidin.

	n	Gesamt-Aktivität	Basal-Aktivität	s
Kontrollen	30	19,8338 ± 0,9509	7,8729 ± 0,5970	] n.s.
Kontrollen + 2 x 10 ⁻⁵ k-Stroph.	19	13,9450 ± 1,1378	8,5263 ± 0,9276	
250 R	19	14,0645 ± 0,5623	4,2632 ± 0,5437	] p < 0,025
250 R + 2 x 10 ⁻⁵ k-Stroph.	24	11,6076 ± 0,4728	5,9930 ± 0,5834	
500 R	22	13,0069 ± 0,7515	6,0217 ± 0,5466	] p < 0,005
500 R + 2 x 10 ⁻⁵ k-Stroph.	23	8,6563 ± 0,4305	3,7850 ± 0,5631	
1500 R	20	7,2673 ± 0,5770	2,8009 ± 0,3062	] n.s.
1500 R + 2 x 10 ⁻⁵ k-Stroph.	16	5,9727 ± 0,4758	2,6495 ± 0,4203	

Tab. 3: Einfluß von 2 x 10⁻⁵M k-Strophanthidin auf die Gesamt- und Basal-Aktivität ($\mu\text{Mol PO}_4^{3-} / \text{mg Protein} / \text{h}$) der ATPase von Meerschweinchenherzen, ferner strahlenbedingte Beeinflussung beider Parameter (30 min nach lokaler Bestrahlung mit 250, 500 und 1 500 R) und zusätzlicher Effekt von 2 x 10⁻⁵M k-Strophanthidin. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Werte der Basal-Aktivität.

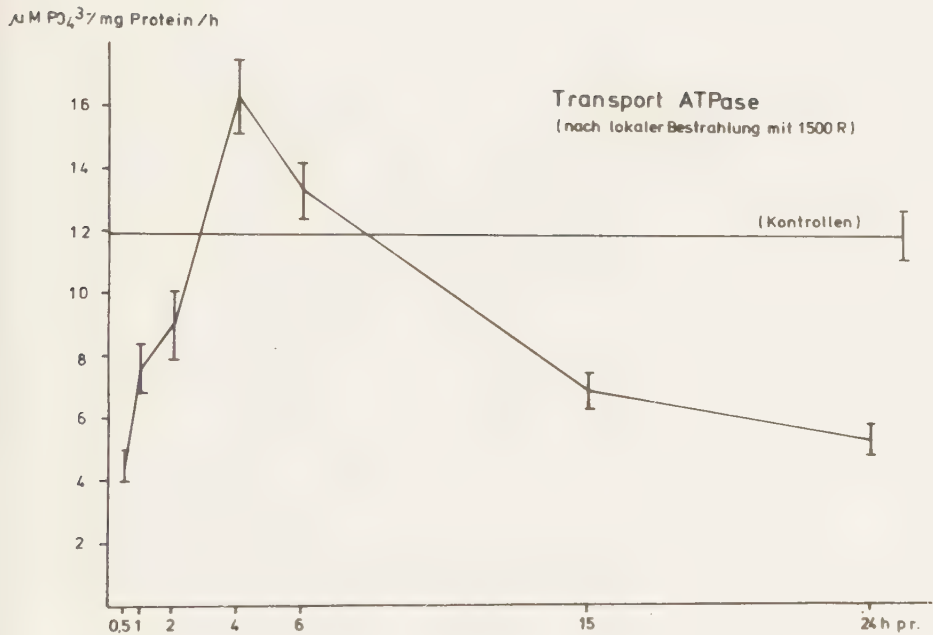


Abb. 5 : Transport-ATPase ($\mu\text{M PO}_4^{3-} / \text{mg Protein} / \text{h}$) von Meerschweinchen-Ventrikeln nach lokaler Bestrahlung mit 1500 R (Zeitabhängigkeit).

	n	Gesamt-Aktivität	Basal-Aktivität	s
Kontrollen	30	19,8338 ± 0,9509	7,8729 ± 0,5970	
30 min	20	7,2673 ± 0,5770	2,8009 ± 0,5062	p < 0,0005
60 min	23	13,1964 ± 0,7874	5,5624 ± 0,8809	p < 0,025
2 h	19	18,4473 ± 1,1109	9,2435 ± 1,1673	n.s.
4 h	22	35,6143 ± 0,9430	19,5104 ± 1,2179	p < 0,0005
6 h	23	31,6960 ± 1,1246	18,7608 ± 0,8077	p < 0,0005
15 h	18	28,8929 ± 1,5510	22,0376 ± 1,3252	p < 0,0005
24 h	22	21,1621 ± 1,1187	15,8285 ± 0,9583	p < 0,0005

Tab. 4 : Gesamt- und Basal-Aktivität der ATPase ($\mu\text{Mol PO}_4^{3-}$ / mg Protein / h) von Meerschweinchenherzen nach lokaler Bestrahlung mit 1 500 R. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ mittlere Fehler der Mittelwerte n = Anzahl der Versuche. Die Angabe der Signifikanzen bezieht sich auf die Basal-Aktivität.

4. DISKUSSION

4.1. Strahlensensibilität des Membran- ATPase Systems

In den Experimenten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, konnte beschrieben werden, daß zu den Eigenschaften des Membran- ATPase- Systems neben den in den Abschnitten 1.1. und 1.2. bereits dargestellten auch die der Strahlensensibilität gehört. Es besteht eine Abhängigkeit der Bestrahlungswirkung von der applizierten Strahlendosis (Abb. 1. und Tab. 1.). Die von vielen Autoren (62, 78, 122, 135), unter anderem auch von PRIGNITZ (96, 97) am Herzmuskel nachgewiesenen Elektrolytverschiebungen nach Bestrahlung lassen sich damit in Verbindung bringen, wenn man annimmt, daß die Mg^{2+} -abhängige, Na^{+} - und K^{+} - aktivierbare ATPase, auch hier Transport- ATPase genannt, eng mit dem Transport von Ionen, besonders Na^{+} - und K^{+} - Ionen, durch die Membran korreliert ist (91, 92, 94, 115, 119, 127). Die hier gemachten Aussagen beziehen sich, wie man einschränkend sagen muß, auf eine Temperatur von $37^{\circ} C$, da die ATPase im lebenden Tier bestrahlt wurde und auf ein Milieu, in dem eine Hemmung von aktiven Transportvorgängen praktisch ausgeschlossen werden kann. Daher konnten hier auch nicht Vermutungen überprüft werden, ob die Strahlenschäden bei tiefen Temperaturen (etwa $+ 4^{\circ} C$) oder anderen Bedingungen, unter denen der aktive Transport zum Erliegen kommt, sich solchen unter stoffwechselaktiven Umständen gegenüber vergrößern. Aus diesen Überlegungen wurde ja, wie bereits in 1.3. erwähnt, geschlossen, daß die aktiven Transportmechanismen dem Strahlenschaden eher entgegenwirken als durch ihm gehemmt werden (77, 78, 142). Angesichts der Tatsache aber, daß

dieser aktive Transport seinen Energiebedarf aus der ATP-Spaltung durch das Membran- ATPase-System deckt (91, 92), dieses aber unter den hier beschriebenen Umständen bereits durch relativ niedrige Strahlendosen (250 - 3 000 R) stark (bis zu 70 %, s. Abb. 1.) gehemmt wird, sind doch Zweifel an obigen Aussagen anzumelden, da die aktiven Vorgänge bei verminderter Energielieferung durch das Enzym zumindest in geringerem Umfang und damit wesentlich weniger effektiv ablaufen werden. Ob allerdings die hier beschriebene Beeinträchtigung des energieliefernden Systems Membran- ATPase durch die Röntgenstrahlen allein für die beobachteten Elektrolytverschiebungen verantwortlich zu machen sind, oder ob im Zuge der Strahlenschädigung vielleicht noch andere Strukturelemente der Membranen zerstört werden, so daß Veränderungen in den passiven Ionenbewegungsverhältnissen eintreten, läßt sich ebenfalls nicht eindeutig entscheiden. Es spricht allerdings einiges dafür, wie oben dargestellt, daß in der strahlenbedingten Hemmung des Enzymsystems ein wesentlicher Teil der Ursachen der strahleninduzierten Ionenverschiebungen zu sehen ist.

Tab. 4. und Abb. 5. haben eine zeitliche Entwicklung des Strahlenschadens auf das Membran-ATPase- System deutlich gemacht. Verfolgt man diese, so kann man, anhand der Veränderungen der Transport- ATPase-Aktivität in dem von uns untersuchten Zeitraum bis 24 Stunden p.r. am deutlichsten, zwei Phasen beobachten: eine sehr frühe, bis 30 Minuten etwa, und eine späte, von 6 bis 24 Stunden p.r. . Letztere könnte man vielleicht aus dem Kurvenverlauf heraus als die Phase eines

eventuell bleibenden Schadens ansehen. Zwischen diesen beiden liegt ein Zeitabschnitt, in dem die Enzymaktivitäten sogar über die unbestrahlter Kontrollen hinaus aktiviert werden. Dies spricht für eine Reparatur auf direktem oder indirektem Wege. Direkt hieße in diesem Falle, daß man eine Schädigung des Enzyms selbst durch die Bestrahlung annimmt und eine nachfolgende Reparatur auch an ihm angreift. Indirekt würde eine Wiederherstellung gestörter Strukturelemente der Membranen, die eine Aktivitätsminderung des Enzyms mit sich gebracht haben, mit nachfolgender Normalisierung dieser Aktivitätswerte bedeuten. Es sind derartige Reparatursmechanismen in der Literatur vermutet bzw. beschrieben worden. Der ersten Vorstellung, nämlich der der direkten Reparatur, zuordnen kann man Überlegungen, die in der Reduktion von -S-S- Brücken in den Strukturproteinen und der ATPase einen solchen Vorgang sehen (35, 51, 101). Als "Reparaturenzym" wird die Glutathion- Reductase, E.C. 1.6.4.2., angenommen (20, 84, 135). Nicht auszuschließen ist, daß eine solche Reparatur auch an in wesentlichen Positionen SH- Gruppen enthaltenden Membranstrukturproteinen stattfindet. Damit wäre die zweite oben beschriebene Möglichkeit angesprochen, der auch die Vorstellungen von EIBL et al. (27) von repair- Cyclen, die an den Membranlipiden angreifen und als wesentliches Enzym hier eine Acyltransferase vermuten lassen, Rechnung tragen (142).

Man könnte also den Aktivitätsgipfel der Transport- ATPase 4 Stunden p.r. (Abb. 5.) und der allein Mg^{2+} - abhängigen ATPase 15 Stunden p.r. (Tab. 4.) als Folge einer überschießenden reparativen Reaktion der Zellen ansehen. Dies

erscheint uns aber, vor allem angesichts der Größe der Steigerung, über die Kontrollwerte hinaus, nicht als ausreichend. Hier muß man sich, wie bereits oben angemerkt, kritisch fragen, ob die Meßwerte der Tabellen wirklich "echte" Aktivitätswerte des Enzyms aus der Mikrosomenfraktion widergeben, oder ob nicht auch Fehlergrößen durch die Methode mit einzubeziehen sind. Es scheint im Hinblick auf das präparative Verfahren (36) als möglich, daß ein Teil der allein Mg^{2+} -abhängigen ATPase nicht aus den Mikrosomen sondern aus den Mitochondrien der Myokardzellen stammt. Dieser Fehler wäre allerdings ein systematischer und würde sich gleichermaßen durch alle Ergebnisse ziehen und so an Bedeutung verlieren. Wichtiger erscheint jedoch die Betrachtung des Verhaltens von eventuell mitpräparierten Mitochondrien nach der Bestrahlung (14). Hier treten nämlich etwa nach 3 bis 6 Stunden p.r. (1), also genau zu der Zeit, da auch die Aktivität der Basal-ATPase p.r. in unseren Versuchen anzusteigen beginnt, Strukturschäden auf, die bis zur Lysis führen. Es ist also denkbar, daß diese Mitochondrienfragmente mit den Mikrosomen bei der fraktionierten Zentrifugation sedimentieren und so für die hohe Basalaktivität verantwortlich sind. Unter Berücksichtigung des Verfahrens, zur durchgeführten Bestimmung der Transport-Aktivität, kann man allerdings sagen, daß die Werte für Basal- und damit auch Gesamtaktivität zwar absolut zu hoch sind, die Transportaktivität aber, als eine als Differenz zwischen beiden errechnete Größe, in ihren richtigen Relationen angegeben ist.

Der starke Anstieg der Basalaktivität 6 Stunden p.r. ließe sich demnach zumindest zum

Teil auf die etwa gleichzeitig auftretenden strahleninduzierten Schädigungen an den Mitochondrien zurückführen. Eine befriedigende Erklärung über die oben vermutete überschießende Reparation an der Transport- ATPase hinaus allerdings läßt sich für dieses Enzym hier nicht finden.

4.2. Mögliche Angriffspunkte des Strahlenschadens.

Zusammen mit den bereits in 4.1. diskutierten Ergebnissen zeigt die in Kapitel 3.2. dieser Arbeit dargestellte Additivität von herzaktiver Glykosidwirkung und Bestrahlungsfolgen (Abb. 3. und 4., Tab. 2. und 3.) die Wahrscheinlichkeit dafür auf, daß beide einen gemeinsamen Angriffspunkt, nämlich die Mg^{2+} - abhängige, Na^{+} - und K^{+} -aktivierbare Membran- ATPase haben. Dafür sprechen auch die in ähnlicher Weise nach Glykosidbehandlung (4, 5, 12, 28, 73, 91, 92, 147) und Bestrahlung (62, 78, 96, 97, 122, 135) auftretenden Elektrolytverschiebungen. Dadurch wird die Frage aufgeworfen, wie die Röntgenstrahlen oder deren Ionisationsprodukte, allen voran wohl $OH\cdot$ - Radikale aus der Wasserradiolyse (s. 1.3.), solche derartigen Veränderungen hervorrufen können.

In Kapitel 1.2. dieser Arbeit ist bereits ein Funktionsmodell für die ATPase unter Einbeziehung der Wirkung von herzaktiven Steroiden nach SEN et al. (119) dargestellt. Es beruht auf der vielfach angestellten und belegten Annahme eines phosphorylierten Intermediates der Transport-ATPase (4, 5, 93, 113, 115, 119, 147) das in

Gegenwart und Mitwirkung von Mg^{2+} - und Na^{+} -Ionen gebildet, in Gegenwart von K^{+} -Ionen gespalten wird. Das Enzym E verändert hierbei seine Konformation von E_1 nach E_2 und wieder zurück zu Form E_1 . Aus diesen Konformationsveränderungen wird ein dem SCHATZMANN'schen (115) ähnliches Carriermodell entwickelt (94) Kapitel 1.2. dieser Arbeit.

Veränderungen der Konformationen von Membranstrukturproteinen sind auch als eine mögliche Wirkung ionisierender Strahlen beschrieben worden (6, 123, 134). Diese werden einmal vermutet als indirekte Änderungen an den Proteinen durch Schädigung der eng mit ihnen vergesellschafteten Membranlipide (72, 82), hier besonders des Phosphatidylserins (146) nach Bestrahlung (26, 142). Schädigung an diesen hat nach MARTONOSI (72) ursächlich eine Konformationsveränderung der Membranproteine zur Folge. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, daß man Lipopolysaccharide aus Bakterienwandstrukturen als strahlenresistenz erhöhende Stoffe einsetzen kann. Der genaue Wirkungsmodus ist allerdings noch nicht geklärt (66). Auch eine direkte Einflußnahme der Röntgenstrahlen auf die Tertiärstruktur der Proteine wird für denkbar gehalten (s. Kapitel 1.3. dieser Arbeit). Wichtig als Angriffspunkt sind außerdem die SH-Gruppen und -S-S-Brücken in diesen Proteinen, die, wie bereits erwähnt, als äußerst strahlensensibel gelten (6, 62, 78, 80, 109, 122, 123, 149). Die SH-Gruppen nehmen nach Bestrahlung von Zellmembranen ab (108, 109, 149). Gibt man zu Zellen in geeignetem Milieu SH-Blocker hinzu, so sieht man ähnliche Elektrolytverschiebungen wie nach Bestrahlung (79, 124). Dies

alles, zusammen mit der Tatsache, daß SH- Gruppen-enthaltende Substanzen, wie etwa Glutathion (122) oder Cystein (69, 95) und andere mehr (21, 35, 65, 105, 107) als Strahlenschutzsubstanzen verwendbar sind, die teilweise einen erheblichen Effekt aufweisen, zeigt die Bedeutung dieser Protein-SH- Gruppen in diesem Zusammenhang hin.

Die Membran- ATPase selbst enthält ebenfalls solche SH- Gruppen (120, 126, 127), die, in der Nähe des aktiven Zentrums gelegen, eine Bedeutung für die Funktionsfähigkeit des Enzyms haben sollen (94). Auch kann man das Enzym durch SH- Blocker wie p- Chlormercurobenzoesäure (p- CMB) in seiner Aktivität hemmen (4, 101, 129). Weiterhin könnte man durch die bereits mehrmals genannte Ähnlichkeit der Elektrolytverschiebungen nach solchen SH- Blockergaben mit denen nach Bestrahlung zu der Auffassung gelangen, daß ein wesentlicher Teil der strahlenbedingten Hemmung des Membran- ATPase- Systems auf strahleninduzierte Oxidation dieser für die Funktion bedeutsamen SH- Gruppen zurückzuführen sei. MYERS und CHURCH (80) weisen jedoch darauf hin, daß die nach Bestrahlung meßbare Reduktion der SH- Gruppenanzahl nach ihrer Meinung viel zu gering sei, als daß sie die auftretenden Elektrolytverschiebungen damit erklären könnten. Auch war in ihren Versuchen eine Hemmung des Enzyms viel stärker erkennbar, wenn an Stelle von Bestrahlung SH- Blocker appliziert wurden. So ist wohl zu vermuten, daß die strahlenbedingte Oxidation von diesen SH- Gruppen eher bei den Konformationsveränderungen der Membranstrukturproteine, die nach Bestrahlung angenommen werden, eine Rolle spielen, als daß sie direkt Einfluß auf die Funktion des Enzyms nimmt.

Vergleicht man die hier als möglich beschriebenen Veränderungen der Membranstrukturen Proteine und Lipide, die sich zwangsläufig auf das darin eingebettete ATPase- System auswirken müssen, und die Möglichkeiten der Zerstörung am Enzymmolekül selbst, das ja ebenfalls ein Protein ist und so auf gleiche Art durch ionisierende Strahlen geschädigt werden kann wie die übrigen Eiweißstrukturen, mit den Vorstellungen über die Glykosidwirkungen (s. Kapitel 1.2.), so erkennt man, daß man im Falle der Strahlenschäden einen Angriffspunkt nicht so genau zu definieren vermag wie bei den herzaktiven Steroiden. Man vermutet, daß Verbindungen vom Digitalistyp die Konformation E_1-P des phosphorylierten Intermediates des Enzyms stabilisieren, so daß dieses nicht in E_2-P übergeführt und in Gegenwart von K^+ - Ionen gespalten werden kann (147). Man denkt also an eine Verzögerung dieses Ablaufs und damit eine nachfolgende Aktivitätsminderung des Enzyms. Ein so spezifischer Eingriff durch die Bestrahlung ist wohl kaum vorstellbar, da sie nicht gerichtet sondern ganz diffus durch immer weiterführende Ionisation ihre Schäden setzt. Sie wirkt dabei dort am effektivsten, wo sie auf den geringsten Widerstand trifft, wie dies durch die "weak- link-Hypothese" recht gut beschrieben wird (142). Es ließe sich somit folgende Theorie der Strahlenwirkung auf das Enzym entwickeln:

Die ionisierenden Strahlen werden durch diffuse Zerstörung solcher "loci minoris resistentiae" die Struktur der Membranen so verändern, daß es zu einer Hemmung der Enzymaktivität kommt. Dies geschieht, dem oben dargestellten entsprechend, so, daß entweder die umgebende

Lipidproteinstrukturen in der Membran oder das Enzymmolekül selbst angegriffen und verändert werden, wodurch eine zur Entfaltung des Wirkungsoptimums des Enzyms ungünstige Konformation entsteht. Dies hat (im in-vitro-Versuch, wie allerdings einschränkend gesagt werden muß) nach außen hin ähnliche Auswirkungen zur Folge wie der gezielte Angriff eines Cardenolids am Enzymmolekül.

4.3. Schlußbetrachtung

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen eine dosisabhängige Hemmung durch ionisierende Strahlen der Mg^{2+} - abhängigen Na^{+} - und K^{+} - aktivierbaren Adenosintriphosphatase als Teil des Membran- ATPase- Systems des zu den erregbaren Geweben zählenden Myokards erkennen. Diese Hemmung scheint auf die Elektrolytverhältnisse an der Membran ähnliche Auswirkungen zu haben wie eine durch herzwirksame Steroide herbeigeführte Aktivitätsminderung dieses Enzyms. Sie ist bereits bei Strahlendosen zu sehen, die therapeutisch angewandt werden (250 - 3 000 R). Ob die durch Glykoside induzierten Wirkungen ebenfalls durch therapeutische Konzentrationen dieser Stoffe erzielt werden können, oder ob man dazu toxische Dosen anwenden muß, ist in der uns bekannten Literatur bisher noch stark umstritten (2, 3, 12, 15, 28, 45, 86, 94, 102, 103). Bei einer Herddosis von 3 000 R erreicht man bereits eine maximale Hemmung des Enzyms von 70 % der Kontrollaktivitäten, die nicht bestrahlt wurden. ERDMANN und SCHONER (28) weisen darauf hin, daß in dem Moment, wo die Sättigung eines Digitalisrezeptors, den sie in dem Membran-ATPase- Systems sehen, 50 % übersteigt, nicht mehr

mit positiv inotropen, also therapeutischen, sondern mit toxischen Wirkung auf diese Pharmaka zu rechnen sei. Ein anderer Autor (104) gibt diese Grenze schon mit 30 % an. 3000 R sind eine Strahlendosis, wie sie in der Strahlentherapie von z.B. linksseitigen Mamma- und Bronchialkarzinomen im Myokard erreicht werden können, aber auch schon niedrigere Dosen genügen, wie aus Abb. 1. hervorgeht, um wesentliche Hemmungen des Enzyms herbeizuführen. KOLAR (61) hat 1971 in einer zusammenfassenden Arbeit funktionelle Veränderungen am Herzen beschrieben wie Rhythmus- und Repolarisationsstörungen als Bestrahlungsfolge beschrieben, die von DOSSEN und VRANTSCHURA (24) in ähnlicher Weise bei Hodgkin- Patienten während der Strahlentherapie gefunden wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, daß zumindest ein Teil der am bestrahlten Myokard beobachteten Elektrolytverschiebungen auf die Hemmung der Membran- ATPase zurückzuführen sind und man so vermuten könnte, daß letztendlich ursächlich nicht jene (vgl. Kapitel 1.5. dieser Arbeit und 59) sondern diese Enzymhemmung p.r. wesentlich an der Ausbildung der dort beschriebenen morphologischen, elektrophysiologischen und klinischen Strahlenschäden beteiligt sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

An einer durch fraktionierte Zentrifugation präparierten Mikrosomenfraktion aus Myokardzellen des Meerschweinchens wurde das Verhalten eines Mg^{2+} -abhängigen, Na^{+} - und K^{+} -aktivierbaren Adenosintriphosphatase-Systems nach Bestrahlung untersucht. Sein durch Na^{+} - und K^{+} -Ionen aktivierbarer Teil, auch Transport-ATPase genannt, erwies sich als besonders strahlensensibel.

Bereits 30 Minuten p.r. wurde die Transport-ATPase durch eine Strahlendosis von 250 R gehemmt. 1 500 R riefen 60 % Hemmung gegenüber unbestrahlten Kontrollen hervor. Das Maximum der Aktivitätsminderung 30 Minuten p.r. wurde durch 3 000 R mit 70 % erreicht.

Die Beobachtungen eines durch 1 500 R gesetzten Strahlenschadens bis 24 Stunden p.r. ergab drei Phasen der Entwicklung. In der ersten, bis 30 Minuten p.r., wurde die Aktivität der Transport-ATPase gehemmt. Danach setzten Reparaturvorgänge ein, die 4 Stunden p.r. einen Gipfel erreichten, der deutlich über den Kontrollwerten lag. In der dritten Phase sank die Aktivität wieder ab und erreichte nach 15 und 24 Stunden nach Bestrahlungsende fast wieder die gleichen Werte wie nach 30 Minuten, die für diese Strahlendosis ein Maximum darstellten.

K-Strophanthidin (2×10^{-5} Mol/l) und Digoxin ($2,5 \times 10^{-7}$ und 5×10^{-7} Mol/l) hemmten in diesen Konzentrationen die Transport-ATPase signifikant. Wendete man Bestrahlung und herzaktive Steroide gleichzeitig an, so addierten sich ihre

Wirkungen.

Strahleninduzierte Elektrolytverschiebungen, aktiver Transport und strahlenbedingte Hemmung der Transport- ATPase wurden miteinander in Verbindung gebracht und dahingehend diskutiert, daß die Veränderung der Elektrolytverhältnisse an den Membranen nach Bestrahlung zumindest teilweise als Folge der beschriebenen Hemmung der Transport- ATPase auftreten.

Als Angriffspunkt für ionisierende Strahlen in den Membranen der Myokardzellen wurden die Strukturproteine, die Lipide und die Enzymmoleküle des Membran- ATPase- Systems selbst vermutet. Aus Wirkungsmodellen für Glykoside auf das Transportenzym zusammen mit Vorstellungen über die Strahlenwirkung auf biologische Einheiten entwickelten wir für die strahleninduzierte Schädigung des Enzyms die Überlegung, daß durch Oxidation der Membranstrukturen eine zur Entfaltung des Wirkungsoptimums ungünstige Konformation des Enzyms entsteht.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1.) AHRENDTS, R.
Über die Wirkung subletaler Röntgendosen auf
die Mitochondrien kultivierter Zellen bei
gleichzeitiger Darstellung der Mg^{++} - abhängigen
Adenosintriphosphatase
Strahlentherapie 143/ 5 (1972) 576
- 2.) AKERA, T., F.S. LARSON, and T. M. BRODY
Correlation of cardiac sodium- and potassium-
activated adenosine triphosphatase activity
with ouabain- induced inotropic stimulation
J. Pharmacol. Exp. Ther. 173 (1970) 145
- 3.) AKERA, T., S.I. BASKIN, T. TOBIN, and T.M. BRODY
Ouabain: Temporal relationship between the
inotropic effect and the in vitro binding to,
and dissociation from, $(Na^{+} + K^{+})$ - activated
ATPase
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277 (1973)
151
- 4.) ALBERS, R.W., G.J. KOVAL, and G.J. SIEGEL
Studies on the interaction of ouabain and other
cardio-active steroids with sodium-potassium-
activated adenosine triphosphatase
Mol. Pharmacol. 4 (1968) 524
- 5.) ALLEN, J.C. and A. SCHWARTZ
Effects of potassium, temperature, and time on
ouabain interaction with the Na^{+} , K^{+} - ATPase:
further evidence supporting an allosteric site
J. Mol. Cell. Cardiol. 1 (1970) 39
- 6.) ARCHER, J.F. and E.D. WILLS
Effects of ionizing radiation on sulphhydryl and
disulphide components of cultured mammalian
cells
Int. J. Radiat. Biol. 23 (1973) 571

- 7.) AUDITORE, J.V. and L. MURRAY
The localization of the Mg + Na + K - activated
g- strophanthin sensitive ATPase in cardiac
muscle
Arch. Int. Pharmacodyn. 145 (1963) 137
- 8.) BERGEDER, H.D.
Einfluß von Röntgenstrahlen auf isolierte
Muskeln
Strahlentherapie 106 (1958) 309
- 9.) BERGEDER, H.D.
Untersuchungen zum Einfluß ionisierender
Strahlen auf Zellmembranen
I. Änderungen von Erregungsabläufen durch
Röntgenstrahlen
Strahlentherapie 114 (1961) 406
- 10.) BERGEDER, H.D.
Untersuchungen zum Einfluß ionisierender
Strahlen auf Zellmembranen
II. Änderung von Membranpotential und Kalium-
gehalt unter Einwirkung von Röntgenstrahlen
Strahlentherapie 115 (1961) 90
- 11.) BLAU, M. und K. ALTENBURGER
Über einige Wirkungen von Strahlen, II.
Z. Phys. 12 (1922) 315
- 12.) BUSCH, H.R., Jr., J.C. ALLEN, G. GLICK,
and A. SCHWARTZ
Correlation between the inotropic action of
ouabain and its effects on subcellular enzyme
systems from canine myocardium
J. Pharmacol. Exp. Ther. 171 (1970) 1

- 13.) BREUER, H., H.K. PARCHWITZ und C. WINTER
Untersuchungen über den Kalium- und
Natriumgehalt in verschiedenen Organen nor-
maler und adrenaletomierter Ratten nach
Ganzkörperbestrahlung
Strahlentherapie 105 (1958) 579
- 14.) BRIERLEY, G.P., K.M. SCOTT, and M. JURKOWITZ
Ion transport by heart mitochondria
XXI. Differential effects of mercurial reagents
on adenosine triphosphatase activity and
on adenosine triphosphate- dependent
swelling and contraction
J. biol. Chem. 246 (1971) 2241
- 15.) BRODY , T.M.
Discussion paper : Ouabain- induced inhibition
of cardiac ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)- ATPase and the positive
inotropic response
Ann. N.Y. Acad. Sci. 242 (1974) 684
- 16.) CHAPMAN, I.V. and M.G. STURROCK
The effects of X- irradiation in vitro on
the transport of potassium ions in thymocytes
Int. J. Radiat. Biol. 22 (1972) 1
- 17.) CROWTHER, J.A.
Some concentrations relative the the action
of X-rays on tissue cells
Proc. Roy. Soc. 96 B (1924) 207

- 18.) DANIELS, E.W., and L.E. ROTH
X- irradiation of the giant amoeba , *Pelomyxa illinoisensis*
III. Electron microscopy of centrifuged
organisms
Radiat. Res. 14 (1961) 66
- 19.) DAWSON, K., R. SEYMOUR, and D.E. MUTTON
Radiation induced efflux of intracellular potassium
Radiat. Res. 37 (1969) 83
- 20.) DEAKIN, H., M.G. ORD, and L.A. STOCKEN
'Glucose 6- phosphate- dehydrogenase' activity
and thiol content of thymus nuclei from
control and X- irradiated rats
Biochem.J. 89 (1963) 296
- 21.) DEANOVIC, Z., D. PERICIC, and Z. SUPEK
Radioprotective activity of some sulphur analogues of tryptophol and 5- hydroxy- tryptamine
Strahlentherapie 140 (1970) 749
- 22.) DESSAUER, F.
Über einige Wirkungen von Strahlen, I.
Z. Phys. 12 (1922) 38
- 23.) DEWEY, D.L.
The X-ray sensivity of *Serratia marcescens*
Radiat. Res. 19 (1963) 64
- 24.) DOSSEN, G. und D. VRANTSCHURA
Ein kombiniertes Verfahren der Untersuchungen
der Lunge und des Herzens zur Erkennung von frühen
und späten Strahlenschädigungen bei intrathorakaler
Strahlenbehandlung
Strahlentherapie 149 (1975) 375

- 25.) DUTTA, S. and B.H. MARKS
Spaces and ionic influences of the accumulation
by isolated perfused hearts
Br. J. Pharmacol. 46 (1972) 401
- 26.) EBERHAGEN, D. und U. REMLER
Die Lipidveränderungen in verschiedenen Ratten-
organen nach Ganzkörperbestrahlung mit letalen
Röntgendosen
IV. Das Verhalten der einzelnen Leberphosphatide
Strahlentherapie 132 (1967) 441
- 27.) EIBL, H., E.E. HILL, and W.E.M. LANDS
The subcellular distribution of acyltransferase
which catalyze the synthesis of phosphoglycerides
Europ. J. Biochem. 9 (1967) 250
- 28.) ERDMANN, E und W. SCHONER
Eigenschaften des Receptors für Herzglykoside
Klin. Wschr. 52 (1974) 705
- 29.) ESCH, H., H. MILTENBURGER und O. HUG
Die Beeinflussung elektrischer Potentiale von
Algenzellen durch Röntgenstrahlen
Biophysik 1 (1964) 380
- 30.) FAHN, S., G.J. KOVAL, and R.W. ALBERS
Sodium- potassium, activated adenosine triphos-
phatase of Electrophorus electric organ
V. Phosphorylation by adenosine triphosphate - ^{32}P
J. Biol. Chem. 243 (1968) 1993
- 31.) FAJARDO, L.F. and J.D. STEWART
Experimental induced heart disease
I. Light microscopic studies
Am. J. Pathol. 59 (1970) 299

- 32.) FAJARDO, L.F. and J.R. STEWART
Capillary injury preceding radiation-
induced myocardial fibrosis
Radiology 101 (1971) 429
- 33.) FAJARDO, L.F. and J.R. STEWART
Coronary artery disease after radiation
New Engl. J. Med. 286 (1972) 1265
- 34.) FAJARDO, L.F. and J.R. STEWART
Pathogenesis of radiation- induced
myocardial fibrosis
Lab. Invest. 29 (1973) 244
- 35.) FALCONI, C., P. SCOTTO, and P. DE FRANCISCIS
Radioprotection and discovery by dithiothreitol
Experientia 26 (1970) 127
- 36.) FRICKE, U.
Über den Einfluß verschiedener Cardenolide auf
die Herzmuskelfunktion und die Membran- ATPase-
Aktivität bei Meerschweinchen
Dissertation (Mainz) 1970
- 37.) FRICKE, U. und W. KLAUS
Die Haftung verschiedener Cardenolide am Pa-
pillarmuskel und einer mikrosomalen ATPase des
Meerschweinchenherzens
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 268 (1971)
200
- 38.) FRICKE, U. und W. KLAUS
A simple preparation technique for a microsomal
Na-, K- activated ATPase from cardiac tissues
of different species
Prep. Biochem. 4 (1974) 13

- 39.) GAFFEY, C.T.
Electrophysiologic response of sciatic nerves
exposed to 200-kV X- rays and 47.5- MeV protons
Advanc. Biol. Med. Phys. 13 (1971) 351
- 40.) GAFFEY, C.T.
Stimulation of action potentials with
radiation in single cells of *Nitella gracilis*
Int. J. Radiat. Biol. 21 (1972) 11
- 41.) GIBBS, R., P.M. RODDY, and E. TITUS
Preparation, assay, and properties of an Na^+ -
and K^+ - requiring adenosine triphosphatase
from beef brain
J. biol. Chem. 240 (1965) 2181
- 42.) GLITSCH, H.G.
Über einige Eigenschaften des aktiven Na^+ -
Transportes am Myokard
Dtsch. Med. Wschr. 95 (1970) 963
- 43.) GLYNN, I.M.
Activation of an adenosine triphosphatase ac-
tivity in cell membrane by external potassium
and internal sodium
J. Physiol. (Lond.) 160 (1962) 18 P
- 44.) GLYNN, I.M.
The action of cardiac glycosides on ion move-
ments
Pharmacol. Rev. 16 (1964) 381
- 45.) GODFRAIND, T. and A. DE POVER
The inhibition of Na^+ -, K^+ - ATPase of guinea
pig heart microsomes by cardiac glycosides
Arch. Int. Pharmacodyn. 201 (1973) 197

- 46.) GOLDFEDER , A.
Radiosensitivity and metabolic properties
of two tumor types indigenous to the
same host
I. A correlation of cellular structure and
radiosensitivity
Int. J. Radiat. Biol. 3 (1961) 155
- 47.) GOLDFEDER, A.
Radiosensitivity and metabolic properties
of two tumor types indigenous to the
same host
II. Studies on cytoplasmic ultrastructure
following irradiation
Radiat. Res. 27 (1966) 190
- 48.) GORDY, W. and H. SHIELDS
Structure and orientation of free radicals
formed by ionizing radiation in certain
native protein
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 46 (1960) 1124
- 49.) GÜNTHER, J. und O. HUG
Akute Wirkungen von Röntgenstrahlen auf Mem-
branpotentiale und -widerstand von Schnecken-
neuronen
Rad. and Environment Biophys. 11 (1974) 171
- 50.) HAGEN, U.
Bestimmung von Einzel- und Doppelbrüchen
in bestrahlter Desoxyribonukleinsäure
durch die Molekulargewichtsbestimmung
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 134 (1967) 45
- 51.) HAGEMANN, R.F. and J.C. SCHIAER
On the mechanism of modification of
radiation effect by di- methyl- sulfoxide
Experientia 27 (1971) 319

- 52.) HALLHAUER, W., und J. SCHIRRMEISTER
Störungen des Elektrolyt- und Wasser-
haushaltes beim akuten Strahlenschaden
In: Ärztliche Maßnahmen bei außerge-
wöhnlicher Strahlenbelastung
Hrsg. : T.M. FLIEDNER und W. HAUGER
Thieme, Stuttgart 1967
- 53.) HANSEN, U.
Zusammenhänge zwischen den Strahlenbeein-
flussungen der Membranspannung der elektrischen
Reizschwelle und des ohmschen Widerstandes
der Zellmembran von *Nitella flexilis*
Atomkernenergie 12 (1967) 447
- 54.) HERZER, R., R. DENNHARDT und H.J. MERKER
Morphologische Veränderungen am Dünndarm
von Ratten nach Ganzkörperbestrahlung bei
verschiedenen osmotisch induzierten Zuständen
der Resorption und Sekretion (elektromikros-
kopische Untersuchungen)
Fortschr. Röntgenstr. 113 (1970) 101
- 55.) HERZER, R.
Enteraler Natrium- und Flüssigkeitstransport
vor und nach Strahlenbelastung
I. Oberer Dünndarm
Strahlentherapie 147 (1974) 531
- 56.) HERZER, R.
Enteraler Natrium- und Flüssigkeitstransport
vor und nach Strahlenbelastung
II. Dickdarm
Strahlentherapie 147 (1974) 649

- 57.) KATZ, A. M., D.I. REPKE, J.E. UPSHAW, and M.A. POLASCIK
Characterization of dog cardiac microsomes.
Use of zonal centrifugation of fractionate fragmented sarcoplasmic reticulum, ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)- activated ATPase and mitochondrial fragments
Biochim. Biophys. Acta 205 (1970) 473
- 58.) KEPNER, G.R. and R.I. MACEY
Membrane enzyme systems.
Molecular size determination by radiation inactivation
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 163 (1968) 188
- 59.) KHAN, M.Y.
Radiation-induced cardiomyopathy
I. An electron microscopic study of cardiac muscle cells
Am. J. Path. 73 (1973) 131
- 60.) KLEIBEL, F.
Klinische Veränderungen am Eisen- Stickstoff- Nukleoprotein- Purin- Phosphor- Elektrolyt- und Wasserhaushalt während der Strahlentherapie
Hrsg.: K.H. KÄRCHER
Urban & Schwarzenberg, München-Berlin 1964
- 61.) KOLÁR, J.
Strahlenfolgen an Herz und großen Gefäßen
Med. Klin. 66 (1971) 661
- 62.) KOLLMANN, G., B. SHAPIRO, and D. MARTIN
The mechanism of radiation hemolysis in human erythrocytes
Radiat. Res. 37 (1969) 551

- 63.) KRESPI, V., H.A. FOZZARD, and W. SLEATOR, Jr.
An adenosine triphosphatase preparation from
a membrane- sarcotubular fraktion of a Guinea
Pig heart muscle
Circulation Res. 15 (1964) 545
- 64.) LANGE, D.
I. Physikalische Grundlagen.
In : 'Kursus: Radiologie und Strahlenschutz'
Hrsg: Radiologisches Zentrum der Universität
Heidelberg
Heidelberger Taschenbuch HT Basistext 112
Springer- Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
1972 S. 11
- 65.) LANGENDORFF, H.
Zum cyclischen AMP- Mechanismus bei der Wirkung
von Strahlenschutzsubstanzen
Naturwissenschaften 57 (1970) 455
- 66.) LANGENDORFF, H., M. LANGENDORFF, K.H. STEINBACH
und J. WECKESSER
Vergleichende Untersuchungen zur Strahlenresistenz-
erhöhenden Wirkung von verschiedenen Bakterien-
Lipopolysacchariden
Strahlentherapie 141 (1971) 214
- 67.) LEA, D.E.
Actions of radiations on living cells
Cambridge: University Press 1947
- 68.) LEH DUK LIEU
Inhibition of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ mG^{2+} - and Ca^{2+} -
dependent ATPase of nuclear membranes
of thymocytes under X- irradiation
Radiobiologiya (Mosk.) 13 (1973) 184

- 69.) LOMAN, H., VOOGD, S., and J. BLOK
Indirect radioprotection by sulfphydryl compounds:
A model chemical system
Radiat. Res. 42 (1970) 437
- 70.) LOTT, J.R. and C.H. YANG
Effects of X- irradiation on ^{22}Na efflux in
isolated nervs
IN : Response of the nervous system to
ionizing radiation p. 271
Ed. Haley, T.J., and R.S. Snider
Boston : Little, Brown & Co. 1964
- 71.) MARSH, B.B.
The estimation of inorganic phosphate in the
presence of adenosine triphosphate
Biochim. Biophys. Acta 32 (1959) 357
- 72.) MARTONOSI, A., J. DONLEY, and R.A. HALPIN
Sarcoplasmatic reticulum
III. The role of phospholipids in the adenosine
triphosphatase activity and Ca^{++} transport
J. Biol. Chem. 243 (1968) 61
- 73.) MATSUI, H. and A. SCHWARTZ
Mechanism of cardiac glycoside inhibition of
the $(\text{Na}^{+} - \text{K}^{+})$ - dependent ATPase from cardiac
tissue
Biochim. Biophys. Acta 151 (1968) 655
- 74.) MORCZEK, A.
Ionisierende Strahlen und der Haushalt
anorganischer Kationen. Ein Beitrag zur
biologischen Wirkung energiereicher Strahlen
Georg Thieme, Leipzig 1957

- 75.) MORINO, K.
Studies on the irradiation effects on
normal organs
IV. Electron-microscopic studies on the
mitochondria on mouse heart muscle and
proximal convoluted tubule cells of
kidney
Shikoku Acta med. 26 (1970) 517
- 76.) MUNN, E.A. and P. BLAIR
An electron-microscopic study of structural
changes during the large amplitude
swelling and contraction of isolated beef
heart mitochondria
Z. Zellforsch. 80 (1967) 205
- 77.) MYERS, D.K. and L. LEVY
Adenosine triphosphatase and potassium retention
in X- irradiated erythrocytes
Nature (Lond.) 204 (1964) 1324
- 78.) MYERS, D.K. and R.W. BIDE
Biochemical effects of X- irradiation on
erythrocytes
Radiat. Res. 27 (1966) 250
- 79.) MYERS, D.K. and R. W. BIDE
Effects of thiol-masking agents on the stromata
of rat erythrocytes
Canad. J. Biochem. 45 (1967) 19
- 80.) MYERS, D.K. and M.L. CHURCH
Inhibition of stromal enzymes by X- radiation
Nature (Lond.) 213 (1967) 636

- 81.) NAGANO, K., N. MIZUNO, M. FUJITA, Y. TASHIMA,
T. NAKAO, and M. NAKAO
On the possible role of the phosphorylated
intermediate in the reaction mechanism of (Na^+ -
 K^+)-ATPase
Biochim. Biophys. Acta 143 (1967) 239
- 82.) NAKAO, T., M. NAKAO, N. MIZUNO, Y. KOMATSU,
and M. FUJITA
Purification and some properties of Na, K- Trans-
port ATPase:
I. Solubilization and stability of Lubrol extracts
J. Biochem. 73 (1973) 609
- 83.) NAKKEN, K.F.
Radiation damage to erythrocyte membranes and
its modification
Strahlentherapie 129 (1966) 586
- 84.) NESBAKKEN, R. and L. ELDJARN
The inhibition of hexokinase by disulphides
Biochem. J. 87 (1963) 526
- 85.) NOVI, A.M.
Effects of low irradiation dosis on the
ultrastructure of rat myocardium
Virchows Arch. Abt. B. Zellpathologie 2
(1969) 24
- 86.) OKITA, G.T., R.E. TEN EICK, and F. RICHARDSON
Inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase and digitalis action:
Dissociation from inotropic effects and its
role in digitalis cardiotoxicity
Ann. N.Y. Acad. Sci. 242 (1974) 658

- 87.) OLSON, M., H. HANSEN, L. SMITTEN, and J. TYSON
Changes in exchangeable body sodium and
potassium content in patients with neoplastic
disease treated with irradiation
Am. J. Roentgenol. 109 (1970) 824
- 88.) PORTELA, A., M HINES J.C. PEREZ, D. BRANDES
G.H. BOURNE, P. STEWART, and D. GROTH
Effects of X- irradiation on muscle membrane
Exp. Cell. Res. 21 (1960) 468
- 89.) PORTELA, A., J.C. PEREZ, P. STEWART, and M. HINES
Ion effects in X- ray depolarisation of muscle
membrane
Exp. Cell. Res. 31 (1963) 281
- 90.) PORTELA, A., J.C. PEREZ, P- STEWART, M. HINES
and V. REDDY
Radiation effects on water permeability and
distribution in frog muscle cells
Radiat. Res. 47 (1971) 704
- 91.) PORTIUS, H.J. und K.R.H. REPKE
Darstellung des $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ - aktivierten, Mg^{++} -
abhängigen Adenosintriphosphat- Phosphorylase-
Systems des Herzmuskels durch Isolierung von
Zellmembranen
Acta biol. med. germ. 19 (1967) 879
- 92.) PORTIUS, H.J. und K.R.H. REPKE
Eigenschaften und Funktion des $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ - akti-
vierten, Mg^{++} - abhängigen Adenosintriphosphat
Phosphorylase-Systems des Herzmuskels
Acta biol. med. germ. 19 (1967) 907

- 93.) POST, R.L., A.K. SEN, and A.S. ROSENTHAL
A phosphorylated intermediate in adenosine
triphosphate- dependent sodium and potassium
transport across kidney membranes
J. biol. Chem. 240 (1965) 1437
- 94.) POST, R.L., S. KUME, T. TOBIN, B. ORCUTT, and
A.K. SEN
Flexibility of an active center in sodium- plus-
potassium adenosine triphosphatase
J. Gen. Physiol. 54 (1969) 907
- 95.) POWER, J.A., L.S. GOLSTEIN, and J.W. HARRIS
Letter: A test of the "mixed-disulfide" hypo-
thesis of cysteamine radioprotection
Int. J. Radiat. Biol. 26 (1974) 91
- 96.) PRIGNITZ, R. und G. HOFFMEISTER
Untersuchungen über den Einfluß von Röntgen-
strahlen auf Elektrolytverschiebungen und Stoff-
wechsel des Herzmuskels
I. Strahlenbedingte Calciumveränderungen am iso-
lierten Meerschweinchenvorhof
Strahlentherapie 145 (1973) 207
- 97.) PRIGNITZ, R., U. MÜLLER und G. HOFFMEISTER
Untersuchungen über den Einfluß von Röntgen-
strahlen auf Elektrolytverschiebungen und Stoff-
wechsel des Herzmuskels
II. Strahlenbedingte Veränderungen der Kalium-
und Natriumkonzentrationen am isolierten
Meerschweinchenvorhof
Strahlentherapie 145 (1973) 427

- 98.) PRIGNITZ, R.
Frühreaktionen des Herzmuskels nach
lokaler Bestrahlung
Habilitationsschrift, Marburg(1975)
- 99.) RAJEWSKI, B.
10 Jahre Forschung auf physikalisch- medi-
zinischem Grenzgebiet
Leipzig 1931
- 100.) RAJEWSKI, B. und H. DÄNZER
Über einige Wirkungen von Strahlen.
VI. Eine Erweiterung der statistischen
Theorie der biologischen Strahlenwirkung
Z. Phys. 89 (1934) 412
- 101.) REGA, A.F., A. ROTHSTEIN, and R.L. WEED
Erythrocyte membrane sulphhydryl groups and the
active transport of cations
J. Cell. Physiol. 70 (1967) 45
- 102.) REPKE, K.R.H.
Über den biochemischen Wirkungsmodus von
Digitalis
Klin. Wschr. 42 (1964) 57
- 103.) REPKE, K.R.H. und H.J. PORTIUS
Molekularbiologische Wertbestimmung von Ver-
bindungen des Digitalistyps
Planta med. Suppl. 4 (1971) 66
- 104.) REPKE, K.R.H.
Biochemische Grundlagen der Entwicklung
neuartiger Herzmittel des Digitalistyps
Pharmazie 27 (1972) 693

- 105.) RÉVÉZ, L., H. BERGSTRAND, and H. MODIG
Intrinsic non-protein sulphhydryl levels and
cellular radiosensitivity
Nature (Lond.) 198 (1963) 1275
- 106.) RÉVÉZ, L. and B. LITTBAND
Variation of the relative sensitivity of closely
related neoplastic cell lines irradiated in
culture in the presence and absence of oxygen
Nature (Lond.) 203 (1964) 742
- 107.) RÉVÉZ, L. and H. MODIG
Effect of X-irradiation on the cellular
sulphhydryl content
Ann. med. exptl. Fenn. 44 (1966) 333
- 108.) RINK, H.R.
Radiation damage to membrane bound sulphhydryl
groups and permeability of yeast cells
Int. J. Radiat. Biol. 27 (1975) 305
- 109.) RINK, H.R.
Folgen und Ursachen strahlenbedingter Elektro-
lytverschiebungen
Habilitationsschrift, Bonn (1975)
- 110.) RITCHIE, D.
Cytoplasmic damage caused by gamma radiation
in *Allomyces javanicus*
Botan. Gaz. 115 (1953) 138
- 111.) RÖTTINGER, E.M.
Sofortwirkungen ionisierender Strahlen auf
Ruhepotential, Leitfähigkeit und Aktionspotential
sowie deren Temperaturabhängigkeit bei *Nitella*
flexilis
Dissertation, Univ. München 1968

- 112.) RÖTTINGER, E.M. und O. HUG
The effect of low-energy X-rays on membrane potentials, membrane resistance, and action potential of *Nitella flexilis*
Radiat. Res. 50 (1972) 491
- 113.) RODNIGHT, R., D.A. HEMS, and B.E. LAVIN
Phosphate binding by cerebral microsomes in relation to adenosine- triphosphatase activity
Biochem. J. 101 (1966) 502
- 114.) ROTHENBERG, M.A.
Studies on permeability in relation to nerv function
II. Ionic movements across axonal membranes
Biochim Biophys. Acta (Amst.) 4 (1950) 96
- 115.) SCHATZMANN, H.J.
The role of Na^+ and K^+ in the ouabain- inhibition of the $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ - activated membrane adenosine triphosphatase
Biochim. Biophys. Acta 94 (1965) 89
- 116.) SCHNEIDER, M.
Einführung in die Physiologie des Menschen
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York
16. Aufl. (1971) 376
- 117.) SCHONER, W.
Zum aktiven Na^- , K^- Transport durch die Membran tierischer Zellen
Angew. Chemie 83 (1970) 947

- 118.) SCHWEITZER, E.
Über spezifische Röntgenschädigungen
des Herzmuskels
Strahlentherapie 18 (1924) 812
- 119.) SEN, A.K., T. TOBIN, and R.L. POST
A cycle for ouabain inhibition of sodium- and
potassium- dependent adenosine triphosphatase
J. Biol. Chem. 244 (1969) 6596
- 120.) SENIOR, A.E.
Relationship of cysteine and tyrosine residues
to adenosine triphosphate hydrolysis by mito-
chondrial adenosine triphosphatase
Biochemistry 12 (1973) 3622
- 121.) SIEBERT, G.
Subzelluläre Strukturen und ihre biologischen
Funktionen
IN: Molekularbiologie S. 13
Hrsg.: T. WIELAND und G. PFLEIDERER
Frankfurt 1967
- 122.) SHAPIRO, B., G. KOLLMANN, and J. ASNEN
Mechanism of the effect of ionizing radiation
on sodium uptake by human erythrocytes
Radiat. Res. 27 (1966) 139
- 123.) SHAPIRO B. and G. KOLLMANN
The nature of membrane injury in irradiated
human erythrocytes
Radiat. Res. 34 (1968) 335
- 124.) SHAPIRO, B., G. KOLLMANN, and D. MARTIN
The diversity of sulfhydryl groups in the
erythrocyte membrane
J. Cell. Physiol. 75 (1970) 281

- 125.) SKOU, J.C.
The influence of some cations on adenosine triphosphatase from peripheral nerves
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 23 (1957) 394
- 126.) SKOU, J. C.
Studies on the Na^+ , K^+ - activated ATP hydrolysing enzyme system.
The role of SH groups
Biochem. Biophys. Res. Comm. 10 (1963) 79
- 127.) SKOU, J.C.
Enzymatic base for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane
Physiol. Rev. 45 (1965) 596
- 128.) SMITH, T.W., H. WAGNER, Jr., J.E. MARKIS, and M. YOUNG
Studies on the localization of the cardiac glycoside receptor
J. Clin. Invest. 51 (1972) 1777
- 129.) SOMOGYI, J.
Irreversible confirmation changes following blocking of SH- groups by mercurials of Na^+ + K^+ activated adenosine triphosphatase system
Abstr. Commun. Meet Fed. Eur. Biochem. Soc. 8. Amsterdam, No. 36 (1972)
- 130.) SOMOGYI, J.
Die klinische Bedeutung der Transport- Adenosin- triphosphatase (I)
Med. Welt 26 (1975) 1076

- 171.) SOMOGYI, J.
Die klinische Bedeutung der Transport- Adenosin-
triphosphatase (II)
Med. Welt 26 (1975) 1145
- 172.) STREFFER, C.
Strahlenbiochemie
Heidelberger Taschenbuch HT 59/60
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)
- 173.) STREFFER, C.
Strahlenbiochemie
Heidelberger Taschenbuch HT 59/60
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1969)
S. 13. nach :
BACQ, Z.M. and P. ALEXANDER
Fundamentals in radiobiology, 2nd edition
Oxford, London, Edinburgh, New York, Toronto,
Paris, Frankfurt
Pergamon Press 1966
- 174.) SUTHERLAND, R.M., J.N. STANNARD, and R.J. WEED
Involvement of sulphydryl groups in radiation
damage to human erythrocyte membrane
Int. J. Radiat. Biol. 12 (1967) 551
- 175.) SUTHERLAND, R.M. and A. PIHL
Repair of radiation damage to erythrocyte
membranes:
The reduction of radiation- induced disulfide
groups
Radiat. Res. 54 (1968) 3000
- 176.) TIMMERMANN, J.
Untersuchungen von Membranveränderungen erreg-
barer Herzzellen nach energiereicher Bestrahlung
Strahlentherapie 148 (1974) 180

- 137.) ULLRICH, M. und U. HAGEN
Über die Empfindlichkeit der Wasserstoff-
brücken in Desoxyribonukleinsäure
Z. Naturforsch. 23 b (1968) 1176
- 138.) USSING, H.H.
IN : H.T. CLARKE
Ion transport across membranes S. 3
New York 1954
- 139.) VAETH, J.M., L.Z. FEIGENBAUM, and M.D.
MERILL
Effects of intensive irradiation on the
human heart
Radiology 76 (1961) 755
- 140.) WALLACH, D.F.H. and D. ULLREY
Studies on the surface and cytoplasmic membrane
of Ehrlich Ascites Carcinoma cells
II. Alkali-cation- activated adenosine triphos-
phate hydrolysis in microsomal membrane
fragments
Biochim. Biophys. Acta (Amst.) 88 (1964) 620
- 141.) WALLACH, D.F.H. and V.B. KAMAT
Plasma and cytoplasmic membrane fragments from
Ehrlich Ascites Carcinoma cells
Proc. Natl. Acad. Sci. 52 (1964) 721
- 142.) WALLACH, D.F.H. und E. WEIDEKAMM
Strahleneffekte an Biomembranen
Klin. Wschr. 51 (1973) 419
- 143.) WEISS, J.
Radiochemistry of aqueous solutions
Nature (Lond.) 153 (1944) 748

- 144.) WEISS, J.
Some aspects of the action of radiation on
aqueous solutions
British J. Radiat. Suppl. 1 (1947) 56
- 145.) WERTHEMANN, A.
Experimentelle Röntgenschädigungen des
Herzmuskels
Strahlentherapie 38 (1930) 702
- 146.) WHEELER, K.P. and R. WHITTAM
The involvement of phosphatidylserine in adenosine
triphosphatase activity of the sodium pump
J. Physiol. 207 (1970) 303
- 147.) WHITTAM, R. , K.P. WHEELER, and A. BLAKE
Oligomycin and active transport reactions in
cell membranes
Nature (Lond.) 203 (1964) 720
- 148.) WHITTAM, R. and K.P. WHEELER
Transport across cell membranes
Ann. Rev. Physiol. 32 (1970) 21
- 149.) WILLS, E.D. and A.E. WILKINSON
The effect of irradiation on subcellular particles.
Destruction of sulfhydryl groups
Int. J. Radiat. Biol. 13 (1967) 45
- 150.) WOLLENBERGER, A. und W. SCHULZE
Darstellung der Na^+ - und K^+ - abhängigen
glykosidempfindlichen Adenosintriphosphatase
des Herzmuskels an der Plasmamembran des
Sarcolemms
Naturwissenschaften 53 (1966) 134

DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Friedhelm Hess für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Dr. Rolf Prignitz bin ich dankend dafür verbunden, daß er mir bei der Vorbereitung und Abfassung dieser Arbeit in vieler Hinsicht anregend und unterstützend zur Seite gestanden hat.

Ein weiterer Dank gebührt auch Frau Gerda Hoffmeister, die durch ihre Hilfsbereitschaft in technischen Fragen sehr zum Gelingen der Versuche beigetragen hat.

Lebenslauf

Am 12.6.1953 wurde ich, Detlev Fröhlich, in Bad Berleburg, Kreis Siegen, als einziger Sohn des Prokuristen Herbert Fröhlich und seiner Ehefrau Erika, geb. Beuter, geboren. Hier verbrachte ich meine Kindheit, besuchte von 1959 bis 1963 die örtliche Volksschule, wechselte im April 1963 auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Johannes-Althusius-Gymnasium über und legte dort am 11.5.1971 meine Reifeprüfung ab. Am 1.7.1971 trat ich als Freiwilliger in die Bundeswehr ein, der ich nach einem Wechsel in die Laufbahn der Sanitätsoffizieranwärter im April 1972 bis heute anhöre. Im April 1972 begann ich an der Philipps-Universität in Marburg mein Studium der Humanmedizin. Während dieser zwölfsemestrigen Ausbildung legte ich folgende Prüfungen ab: Naturwissenschaftliche Vorprüfung im März 1973, Ärztliche Vorprüfung im März 1974, Erste Ärztliche Prüfung im März 1975, Zweite Ärztliche Prüfung im März 1977. Mein Praktisches Jahr absolvierte ich an den Kliniken der Philipps-Universität Marburg in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Radiologie. Den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung bestand ich am 18.4.1978 und erhielt am 18.5.1978 meine Approbation als Arzt. Seit dem 1.5.1978 bin ich als Truppenarzt der Bundeswehr in Roth bei Nürnberg tätig.

Marburg, den 16.6.1978

(Detlev Fröhlich)

VERZEICHNIS MEINER AKADEMISCHEN LEHRER

Amon, H., Aziz, O., Braasch, D., Buchholz, R., Daume, E.,
Dennhard, R., Dittrich, J., Dombrowski, H., Doss, M.,
Egbrink, R., Eißner, H., Eschenbach, C., Exner, G.,
Friederich, H., Gerdes, H., Geus, A., Golenhofen, K.,
Graul, E.H., Grundner, H.G., Habermehl, A., Haberich, F.J.,
Hamelmann, H., Hardewig, A., Havemann, K., Hensel, H.,
Hess, F., Hildebrand, G., Hilgermann, R., Hort, W.,
Huch, A., Ihm, P., Josef, K., Kaffarnik, H., Karlson, P.,
Kleinsasser, O., Koransky, O., Kuni, H., Lange, H.,
Lehmann, F.G., Lorenz, W., Ludwig, G., Lütke, A.,
Mannheim, W., Maroske, D., Martini, G.A., Neurath, F.,
Niemeyer, W., Petry, G., Pohlen, M., Portig, J.,
Pots, P., Rohen, J.W., Rodeck, G., Schaumlöffel, E.,
Schiff, W., Schmidt, W., Schmitz-Moormann, P.,
Siegert, R., Siegrist, J., Solcher, H., Sturm, G.,
Straub, W., Stutte, H., Welge-Lüssen, W., Wendt, G.G.,
Willenbockel, U.

